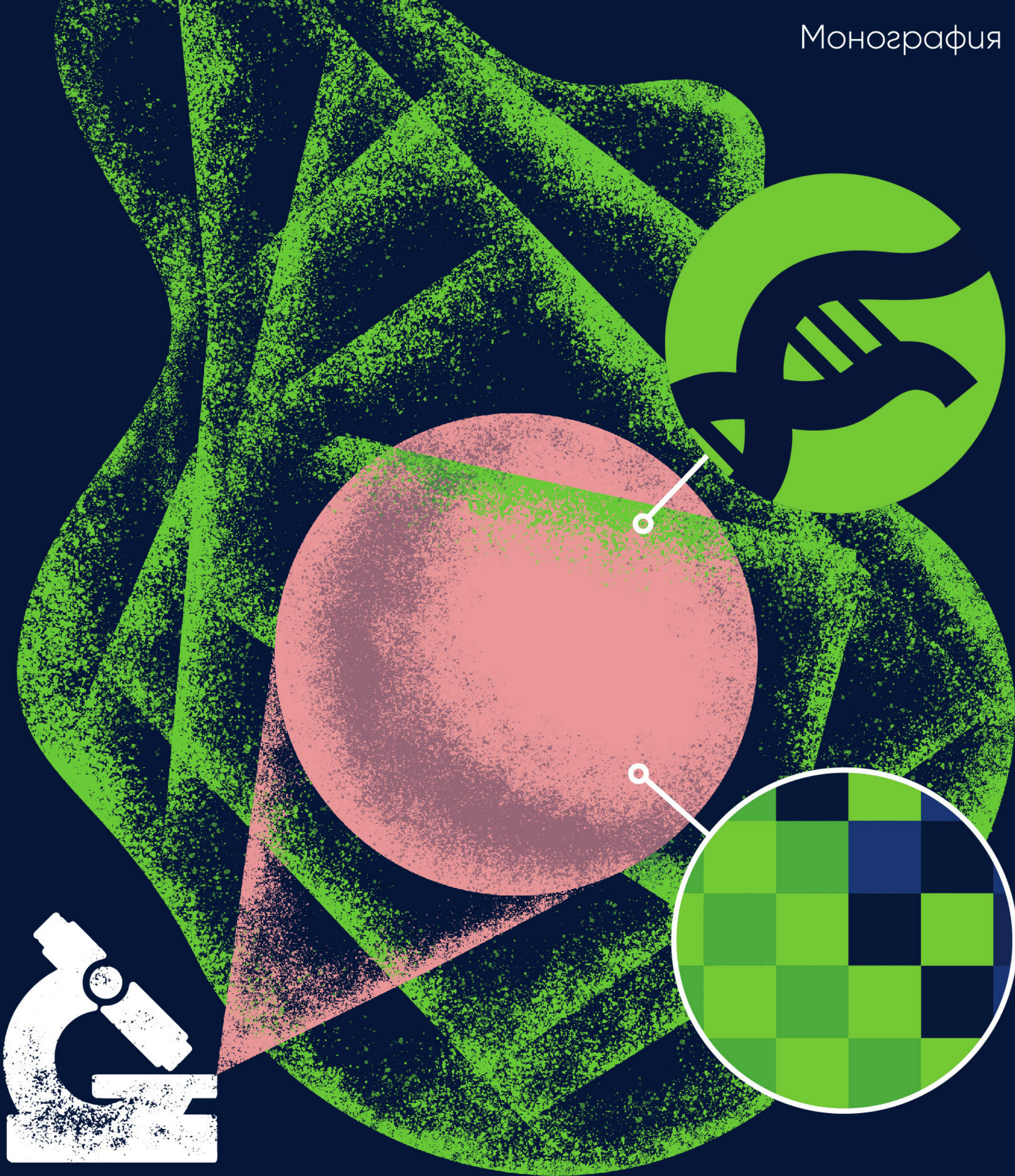
Йордан Йорданов

Анализ на изображения в експерименталната ТОКСИКОЛОГИЯ

Монография



АНАЛИЗ НА ИЗОБРАЖЕНИЯ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛНАТА ТОКСИКОЛОГИЯ

Анализ на изображения в експерименталната токсикология, Монография

Българска
Първо издание

Формат 60×90/16

Печат: Мултипринт - София, 2024

Print ISBN: 978-619-04-0208-4
ePDF ISBN: 978-619-04-0209-1

АНАЛИЗ НА ИЗОБРАЖЕНИЯ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛНАТА ТОКСИКОЛОГИЯ

Монография

Йордан Йорданов, дф

Рецензенти: чл.-кор. проф. Илза Пъжева, дбн

проф. Георги Момеков, дфн

София • 2024

Умишлено оставена празна страница

На Петя и Ивена

Умишлено оставена празна страница

СЪДЪРЖАНИЕ

Чл.-кор. проф. Илза Константинова Пъжева, дбн

Секция QSAR молекулно моделиране,

Институт по биофизика и биомединско инженерство,

Българска академия на науките

РЕЦЕНЗИЯ

на монографията „Анализ на изображения в експерименталната токсикология“

от гл. ас. Йордан Иванов Йорданов, дф

Монографичният труд на гл.ас. доктор Йордан Йорданов на тема „Анализ на изображения в експерименталната токсикология“ се появява в период от развитието на науката и технологиите, в който въпросите за коректната обработка на големи масиви от данни, съдържателната им интерпретация и поставянето на получените знания в служба на научния прогрес и нуждите на обществото, е изключително актуален.

Трудът представя темата и структурата на изследването по разбираем и логичен начин като оптимално комбинира теоретични знания и практически наблюдения. Той започва с анализ на специфичните особености, които имат цифровите изображения и по-специално биоизображенията (отнасящи се до биологични обекти). Анализът обосновава нуждата от интелигентен подход в обработката им, за да бъде извлечена най-съдържателната информация. Това въведение естествено довежда до формулиране на целта на монографията, която най-общо би могла да се определи така – да предостави базови теоретични знания и практически умения по приложението на

методите за анализ на цифрови изображения в неклиничните токсикологични проучвания. В съответствие с целта следва представяне на теоретичните основи с акцент върху свойствата на цифровите изображения, видовете операции и методите, прилагани при обработката им. Систематичният обзор последователно извежда селекцията на най-значимите публикации по темата с акцент върху анализ на биоизображения в областта на експерименталната токсикология. Представени са и основни подходи при анализ на биоизображения по собствени резултати на автора в панел от различни токсикологични изследвания.

Целевата група читатели на монографичния труд са всички изследователи, които се интересуват от обработка на биоизображения. Те могат да бъдат напълно удовлетворени от съдържанието на монографията, тъй като в нея са събрани и обобщени наличните в момента методи, софтуерни продукти със свободен и безплатен достъп, обучителни ресурси и техники, които текущо са разпръснати в различни източници или фрагментирано представени в книги, дисертации, публикации и интернет източници. Считам, че монографията запълва една съществена празнина в нашия научен книжен/електронен пазар и по такъв начин би насърчила употребата на методите за анализ на изображения сред по-широк кръг от изследователи и особено сред онези от тях, които работят в биомедицинската сфера. Следва да се подчертае силно интердисциплинарният характер на труда, който обединява познания в няколко научни области (физика, математика, биология, медицина, информатика и др.). В същото време той се явява своеобразен хибрид между базови теоретични познания и ценни практически съвети, което го прави особено полезен за работещите в полето на биологията и медицината и които имат интерес към темата по анализ на изображения.

По-долу се спирам по-подробно върху някои от основните точки в изложението на представения монографичен труд.

Авторът последователно описва основните стъпки при анализ на изображения (вкл. биоизображения), по-конкретно: генерирането на изображения, предварителната им обработка, същинския анализ, извличането на информация в подходящ формат, интерпретацията на получената информация и формулирането на изводи за релевантните характеристики на обектите в изображението. Всяка от тези стъпки е анализирана като са очертани основните операции и алгоритми за съответната стъпка. Усвоени в дълбочина и описани са голям брой софтуерни разработки за анализ на изображения, които са критично анализирани от гл. т. на тяхната приложимост при обработка на биоизображения. За да постигне това, авторът е изследвал използването им и по такъв начин е придобил ценен практически опит, който обаче не би бил постижим без разбирането на същностните алгоритми и процеси, които са имплементирани в съответните софтуерни продукти и които той адресира в изложението си.

Отделено е специално внимание и на много актуалния напоследък „изкуствен интелект“ (artificial intelligence, AI), проследявайки неговите възможности и ограничения в специфичната за анализ на изображения област. Представени са дълбоките невронни мрежи като инструмент на AI и един от най-успешните методи за обработка на големи масиви от данни, характерни за биоизображенията. Прави впечатление критичният поглед на автора по отношение на обучителните методи и невъзможността им да прогнозират/ класифицират обекти, ако те не са били представени в обучителната група данни на модела, както и трудностите в интерпретацията на изходните резултати, поради липсата на наблюдение върху процеса на обучение. За яснота, той „екстраполира“ тези

проблеми върху биологични обекти, с което адаптира изложението към изследваната тема.

Особено ценна част в монографията е систематичният обзор, който насочва описаните преди него теоретични методологични основи към придобиването на обективна представа за приложенията на методите за анализ на биоизображения в експерименталните токсикологични изследвания. Последните се отнасят до тясната експертиза на автора и са крайната му цел в обработката и анализа на биоизображения. В обзора той се базира на обективна, научно проверена информация, достъпна чрез Core Collection на библиографската информационна система Web of Science (WoS). Авторът се възползва от възможностите, които дава WoS, за да реализира няколко нива на селекция на публикациите, позволяващи му да извлече най-съотносимата към интересуващия го обект научна библиография. Забележителна е селекцията, която тръгва от почти 2 млн. заглавия и се свежда след серията от филтри до около 700 и след допълнителен анализ до около 80 най-значими публикации по експериментална токсикология, интегрираща анализи на изображения. Извършен е задълбочен анализ на тези публикации по отношение на обектите и методите на изследване на токсичност и са очертани тези от тях, които определят най-съвременните тенденции в полето. Проведена е класификация по няколко критерия като вид изследвани вещества, токсикологични дисциплини, експериментална моделна система, вид биомаркер, техника за заснемане и др. Като цяло систематичният обзор е едно оригинално конструирано и аналитично изследване, което заслужава да бъде публикувано като самостоятелна статия, за да стане достояние на по-широка читателска аудитория.

В монографията е включена и глава, насочваща към собствените изследвания на автора, свързана с разработването на подходи за анализ на биоизображения. Изложението е логично конструирано като започва от подбора на подходящ софтуер, анализиран от гл. т. на неговата достъпност, функционална структура, адекватност за изследвания обект, наличен интерфейс, програмни езици и библиотеки, управление на инфраструктура и др. Самостоятелно е разгледан софтуер за дълбоко обучение в съответствие с най-съвременните тенденции на използване на AI. Списъкът от анализирани софтуери е наистина внушителен и разкрива задълбоченото изучаване от автора на техните качества и ограничения. Цитирани са добри практики и е направен анализ на често срещани грешки, очертани са основните тенденции и перспективи в развитието на специализиран за обработка на изображения софтуер, препоръки за избора му, както и възможността за използване на AI-базирани текстови редактори (чатботове) за избор на най-подходящ софтуер. В същия раздел е представена батерия от методи за анализ на изображения в експерименталната токсикология като собствени разработки на автора по отношение на: (а) определяне на конфлуентност на монослой в двумерни клетъчни култури, (б) идентифициране на окръглени клетки с апоптотична морфология, (в) тест за миграция чрез надраскване на монослой, (г) кометен тест, (д) анализ на интензитет и тъканно разпределение на имунохистохимични маркери; (е) анализ на навлизането на флуоресцентни молекули в резистентни туморни клетки. Всичките шест разработки са в различни апликации на анализ и обработка на биоизображения. Те илюстрират как разработените подходи, базирани на изложените в монографията теоретични основи и добри практики, разкриват възможност за извличане на полезна и съдържателна

информация от изследваните биоизображения. Част от тези изследвания са публикувани, за други това предстои.

Достойнство на труда е наличието на възможност за свободен достъп на описаните изследвания чрез QR код до поддържана от автора репозитория, създадена на *GitHub.com.*

Монографията е написана на ясен, професионално издържан език и обхваща най-съвременните публикации в областта. Обемът й е 264 страници и включва 50 фигури, 5 таблици и 405 литературни източника.

В заключение, оценявам високо цялостната научна и практическа стойност на монографията и считам, че тя представлява принос към българската научна школа в областта, а авторът й оценявам като пионер сред анализаторите на биоизображения у нас. В раздела на систематичния обзор, касаещ географското разпределение на публикациите по темата на анализ на изображения с токсикологична тематика, прави впечатление отсъствието на страната ни от списъка на страните с обща публикационна активност. Вярвам, че настоящата монография ще стимулира работещите у нас в областта на експерименталната токсикология, интегрираща методи за анализ на изображения, и ще доведе до появата и трайното присъствие на страната ни на световната карта на изследователите в тази област.

Чл.-кор. проф. Илза Константинова Пъжева, дбн

Проф. Георги Цв. Момеков, дфн

Катедра по фармакология, фармакотерапия и токсикология,

Фармацевтичен факултет,

Медицински университет - София

РЕЦЕНЗИЯ

на монографията „Анализ на изображения в експерименталната токсикология“

от гл. ас. Йордан Иванов Йорданов, дф

Предоставената за рецензия монография е един съвременен и задълбочен прочит на теоретичните основи, методичните подходи, аналитичния и дигитален инструментариум, и на приложните аспекти на методите за анализ на цифрови изображения с транслация в неклиничните токсикологични проучвания. В монографията наред с това е даден адекватен топикален преглед на достъпните технологии и платформи, в това число на софтуерни пакети със свободен достъп, както и на налични обучителни ресурси.

Микроскопските техники се развиха изключително интензивно през последните десетилетия, което доведе до експоненциално нарастване на броя, сложността и размера на генерираните при биомедицински студии дигитални биологични изображения. Анализът на изображения е научна област, възникнала през 60-те години и отдавна е еволюирала в континуум от инструментални методи и софтуерни продукти с

огромен потенциал за реализации в областта на токсикологията. Несъмнено мощен тласък на тези технологии даде имплементирането на технологиите, базирани на изкуствен интелект, които несъмнено ще оставят неизменим отпечатък върху стратегиите и практическото реализиране на съвременната наука.

Въпреки че анализът на изображения бързо набира популярност в биомедицинските области, все още има пречки пред широкото приложение на тези методи. Това е така, защото въпреки че от десетилетия са разработвани отлични и богати софтуерни инструменти с отворен код за анализ на изображения в момента голям брой биомедицински учени изглежда са обезсърчени от дискомфорта от концептуалното разбиране и боравене с непознати математически или статистически операции и необходимостта да инвестират значително време в обучение или самообучение. С появата на широкомащабни езикови модели и наличието на платформи и модели за дълбоко обучение се появяват нови тенденции и знанието какво предлагат подходите за анализ на изображения ще помогне на изследователите да се възползват максимално от тях чрез прилагане на експериментални методи, свързани с тяхното генериране и обработка. Едновременно с това, цените на необходимия хардуер продължават да падат. Това очертава актуалността на тематиката на представената за рецензиране монография.

В книгата са разгледани в достатъчна дълбочина теоретичните основи на снемането на дигитализирани изображения, подходите за тяхната обработка с извеждане на количествени или полуколичествени параметри, позволяващи използването на тази изследователска модалност като интегрален елемент от съвременните проучвани в областта на биомедицинските науки и в частност неклиничната токсикология. Авторът умело борави

с комплексната терминология и е съумял да компилира пропедевтична информация, която би била полезна за широка аудитория, в т.ч. на широк спектър от специалисти, които имат интерес към аналитична обработка на изображения при провеждане на експериментални проучвания.

Монографията е написана на 225 страници (без съдържанието и библиографията), като включва 50 фигури и 5 таблици. Цитирани са общо 405 литературни източника.

Особено достойнство на работата е, че е фокусирана както върху глобалните характеристики на технологиите за снемане на изображения и тяхното обработване и дигитализиране, така и на специфичните особености, свързани с валидирането на методологията и проблемите на практическата им транслация. Монографията съдържа и систематичен обзор с надлежно представена методология и протокол за подбор и анализ на литературните данни и преглед със систематичен анализ на ключови транслиращи технологията проучвания. На практика в труда като интегрална част е включен първият по рода си систематичен обзор по темата като е предоставен и свободно-достъпен линк към авторски код за алгоритмите на част от представените анализи. Включена е практически-насочена част, съдържаща собствени експериментални приноси, които са дисеминирани под формата на три оригинални пълнотекстови публикации в списания с IF, както и все още непубликувани проучвания, базирани на тази методология.

Убедено считам, че тази монография окупира важна ниша в съвременната българска научна литература и може да бъде препоръчана като компендиум на приложението на подходите за анализ на дигитализирани изображения в токсикологията. Това е една интересна, интелигентно написана монография,

която експлицитно и в необстоятелствена форма представя както теоретичните особености така и възможностите за практическа реализация и ще бъде интересна за широка публика от специалисти.

Проф. Георги Цв. Момеков, дфн

УВОД

Към кого е насочена тази монография

Темата на настоящата монография засяга изследвания в сферата на експерименталната и неклинична лекарствена токсикология, фармакология и патология. Работещите в тази сфера се сблъскват с предизвикателствата, свързани с извличането на максимално количество полезна информация от получените в лабораторни условия изображения от различни *ин витро* и *ин виво* моделни системи. Тъй като интерпретацията на зрителна информация на практика има отношение към всички дялове на биомедицинските науки, този труд ще бъде полезен на всички, които проявяват интерес към темата и биха искали да направят първите си стъпки в преобразуването на субективните оценки на визуална информация в обективни количествени и качествени такива, ползвайки подходящи средства за автоматизация на процеса. Този труд е подходящ за изследователи на всички нива – както опитни изследователи, занимаващи се с конвенционални молекулярни и биохимични изследвания, целящи идентифицирането и количественото охарактеризиране на фенотипни изменения в отговор на експозиция с токсиканти от страна на *ин витро* или *ин виво* моделни системи, така и дипломанти, докторанти, постдокторанти и преподаватели.

Най-важната допълнителна инвестиция във връзка с анализи на изображения е времето, необходимо за запознаване с основните теоретични и практически основи. Веднъж вложено, това време би могло да бъде оправдано с внедряването на

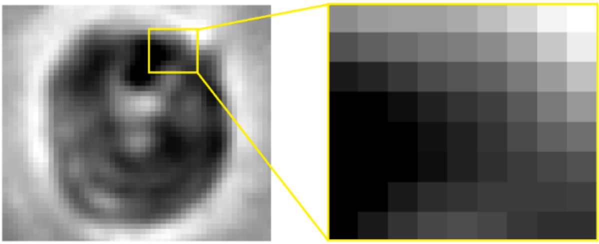
полуавтоматизирани или автоматизирани протоколи, които значително да подобрят бързината и ефективността на анализите, заместващи ръчната обработка и оценка от оператор на изображения, генерирани в хода на експерименталната работа. Друг подход, който би помогнал за оптимизиране и съкращаване на времето за обучение, е сътрудничеството и обменът на опит с групи от утвърдени изследователи с подобна експертиза. Общността от изследователи, които разработват и разпространяват подобни методи и подпомагат обучението на нови специалисти, бързо се увеличава. Например, такива общности с глобално значение са Центърът за отворени анализи на биоизображения, COBA (The Center for Open Bioimage Analysis)[1] в САЩ и Мрежата на европейските анализатори на биоизображения, NEUBIAS (Network of EUropean BioImage AnalystS)[2], на които ще бъде обърнато внимание отново в следващите страници на този труд. Закономерно, с разрастването на общността на изследователите, практикуващи анализи на биоизображения, се увеличава и обемът от свободни ресурси за обучение, което от своя страна би ускорило процеса на популяризирането им.

Особености на цифровите изображения

„Една снимка струва повече от хиляда думи“

Цифровите изображения са средство за съхраняване в цифров вид на пространствена и визуална информация за обекти, които ни интересуват. Изображенията позволяват да бъдат записани определени характеристики на даден обект в определена пространствена перспектива, с определено ниво на детайли, в определен отрязък от време. Целта е на по-късен етап да бъдат възможни визуализация, анализ и интерпретация. При процеса

на заснемане на типичното растерно цифрово изображение, излъчената или отразената от интересуващия ни обект и обкръжението му светлина, преминава през оптическата система на камерата, достига до детекторната система (сензорна матрица, светочувствителна фотоматрица), където бива преобразувана (растеризирана, дискретизирана) в цифрова матрица в паметта на компютъра, състояща се от краен брой цифрови стойности (попадащи в предварително определен интервал, квантувани), определени от интензитета и дължината на вълната на попадналата светлина и чувствителността на детекторната система. Въпреки че това е общото правило, са възможни някои изключения, например когато светлината директно попада върху детекторната система, а фокусът се осъществява не с оптична система, а чрез дълбоко обучение, както е в случая с микроскопията без лещи[3], или пък както е в случая с масспектрометричните изображения, при които вместо оптична система, която да проектира изображението върху детекторната система, чрез моторизирана стойка йонизиращият лъч последователно сканира повърхността на пробата, при което се получават топологично кодирани порции от стойности[4]. Получените цифрови стойности се съхраняват в т.нар. пиксели (съкратено от англ. „**pi**cture e**x**change **el**ement“ или само „**pic**ture **el**ement“, елемент на изображение) и имат точно определени координати в матрицата (в случая с растерно изображение)[5]. Последващата визуализация на получените матрици зависи от избраната цветова схема (какъв цвят и нюанс да съответства на всяка една възможна цифрова стойност на пиксела) и характеристиките на екрана, на който ще бъде представена. Пример за начина на организация на информацията, изграждаща едно типично 8-битово растерно изображение и връзката с приложената цветова схема, е представен на Фигура. 1.



140	155	159	159	170	189	215	244	255
81	96	107	118	126	140	163	200	237
25	37	55	74	85	96	122	155	192
0	0	14	33	51	63	89	122	152
0	0	0	18	33	51	74	96	111
0	0	0	14	33	48	59	70	81
0	0	25	44	51	59	59	59	63
0	25	51	70	77	70	55	48	48

Фигура 1. Пример за 8-битово растерно изображение. Представлява двумерна матрица, като на всяка стойност между 0 (черно) и 255 (бяло) съответства нюанс на сивото . Снимката е заснета в ин витро лабораторията на Секция по Токсикология и представя единична клетка от миша лимфомна линия L5178Y, любезно предоставена от д-р. М. Готсман, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA.

Това е монохромна (черно-бяла) снимка на лимфомна клетка, получена чрез фазово-контрастна микрография. Тъй като снимката е 8-битова, всеки пиксел би могъл да заема 2^8 или точно 256 стойности (от 0 до 255) и съответно цветовата схема, която е приложена на показаното изображение е стандартна палитра, съдържаща 256 нюанса на сивото, включително черно (стойност 0) и бяло (стойност 255). Някои особености на цветовите схеми са разгледани в следващия раздел на монографията.

Комплексност на цифровите изображения

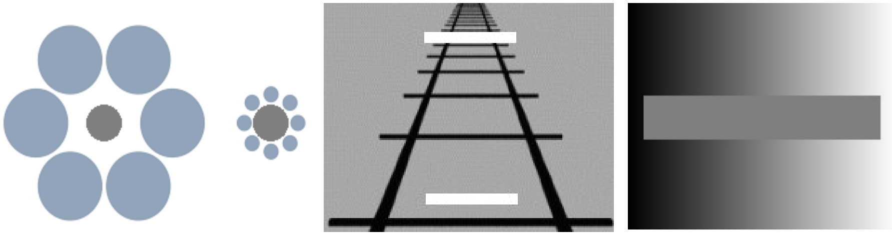
Цифровите изображения могат да бъдат различни видове със съответното ниво на комплексност на организация на съдържащата се информация[6]. Базовият тип цифрово изображение, подобно на показаното на Фигура 1 съдържа количествена информация по отношение на стойността на всеки един пиксел и качествена информация по отношение на взаимното пространствено разположение на пикселите в

матрицата. Така, освен директно достъпната информация по отношение на стойността и координатите на всеки един пиксел, изображенията съдържат и допълнителни слоеве цифрова информация по отношение на характеристиките (брой, форма, вид) на заснетите обекти, която обаче не може директно да бъде получена само чрез прочитане на стойността на определени пиксели. За да бъде представена във вид, който ни позволява да идентифицираме интересуващия ни смисъл, първо трябва да се приложат съответните подходи за преобразуване и анализ на изображението. Извличането на подобна информация от снимки, получени с помощта на съответната микроскопска техника, може да ни даде индиректна или директна представа за протичането на почти всички биологични процеси. Освен изображения, представящи информация от видимата светлина, могат да бъдат генерирани и цифрови изображения, съдържащи информация за физикохимични свойства (електронна микроскопия, атомно-силова микроскопия, силова спектроскопия на единични клетки[7]), интензитет на един или повече флуоресцентни канали (флуоресцентна микроскопия), химичен състав (масспектрометрично заснемане), транскриптомен профил[8,9], различни равнини на обекта (3D изображения, рентгенови, ЯМР изображения), серии от последователно заснети на определен времеви интервал изображения (видео, таймлапс), или пък комбинация от повече от един вид информация. Така получените изображения могат да съдържат слоеве (наслоени пачки от матрици с еднакви форма, размер и координати) с различно ниво на комплексност. По този начин, цифровите изображения представляват вид данни, които могат да бъдат изключително богати на информация.

Предимства на компютърния в сравнение с визуалния анализ на изображения

Зрителната сетивна система е изградена от очите (сензори) и частта от нервната система, свързаната с пренос (сетивен път) и анализ (зрителна зона в кората на крайния мозък) на зрителна информация. Човешката зрителна система е еволюционно усъвършенствана да анализира постъпилата информация в рамките на контекста, което позволява бърза ориентация и предприемане на отговор[10]. Тя е отлично пригодена да интерпретира пространствена ориентация, контури, размери, триизмерна форма, разстояния и така да ни ориентира в заобикалящия ни свят, но пък при определени условия може да ни подведе по отношение на точното възприятие на количествена информация. Това несъвършенство на човешката зрителна система може да бъде илюстрирано с проявата на зрителни илюзии, дължащи се на склонността ѝ винаги да анализира обектите в контекст, например търсейки контрасти между яркостта на обекта и фона, формите на контура и взаимното пространствено разположение на обектите. Например, илюзията на Ебингхаус[11] (Фигура 2 А.) показва, че два кръга с еднакъв диаметър, биват възприети от зрителната ни система сякаш са с различни размери, в зависимост от диаметрите на заобикалящите ги кръгове и разстоянията до и между тях. При илюзията на Понцо[12] (Фигура 2 Б.), поради склонността на зрителната система да търси перспектива, горната хоризонтална бяла черта изглежда по-дълга в сравнение с долната, докато всъщност те са с еднаква дължина. Ефектът на контраста[13] (Фигура 2 В.) пък показва, че поради склонността да се фокусираме върху контрасти между обектите, повечето хора са склонни да възприемат яркостта на вътрешния хоризонтален правоъгълник като различна в левия и десния ѝ край, докато тя е хомогенно оцветена в един нюанс по цялата си дължина.

А. Б. В.



Фигура 2. Примери за зрителни илюзии. А. Илюзия на Ебингхаус[11]*, Б. Илюзия на Понцо*[12]*, В. Ефект на едновременния контраст*[13]*.*

Въпреки че зрителната ни сетивна система не е съвсем прецизна по отношение на количествения анализ, тя е сравнително бърза в преценките си. Това, което отнема време на оператора при „невъоръжена“ оценка на количествените характеристики на цифрови изображения, е необходимостта да се измества зрителното поле при изброяване на обекти и необходимостта от извършване на фината ръчна работа по навигиране на софтуерни инструменти, при които е необходимо насочване на курсора за отбелязване, измерване, писане и управление на менюта. По този начин времето, необходимо за ръчна обработка на изображения, значително надхвърля времето за заснемането им, а голямото количество данни, които могат да бъдат генерирани чрез автоматизирани заснемащи устройства, биха били непосилни за прецизно охарактеризиране и описване с „просто око“. Компютърният анализ преодолява тези предизвикателства, като прилага методи и алгоритми за автоматизирана и обективна оценка на записаната в цифров вид визуална информация.

Многопараметричен анализ с голяма производителност

С възможността за получаване и анализ на огромни обеми от микроскопски изображения или макроскопски изображения от експериментални животни, изследователите могат да създадат многомерни сетове от изображения, които да представят 3D или времева информация. По този начин, в анализа могат да бъдат включени допълнителни променливи за наблюдение, чието съхранение и анализ значително надвишават способностите на човешката зрителна система. Примери за това са получаването на практически непрекъсната времева зависимост при *ин витро* анализ на доза-отговор или пък сложни комбинации от поведенчески характеристики, показващи определени типове токсичен отговор на животинския организъм.

Способността за оползотворяване на тази информация е допълнителна предпоставка за фенотипен скрининг на големи библиотеки съединения без предварителна информация за механизмите им на действие и без предварително зададена хипотеза. Чрез подобни многопараметрични анализи могат, например, да бъдат идентифицирани променливите, които в най-голяма степен се повлияват от токсично въздействие и на базата на това знание да бъдат формулирани научни хипотези, които да насочат посоката на последващи изследвания.

Нужда от анализ на токсикологични изображения

Токсикологичните проучвания не са изключение от останалите биомедицински изследвания, целящи да охарактеризират причинно-следствените връзки между определени въздействия и структурните и функционални промени на различни нива на организация в живата материя. Несъмнено, биоизображенията

могат да разкрият ценна информация за нуждите на различните дялове на токсикологията. Дори в научна област като неклиничната токсикология, която исторически е била сравнително консервативна по отношение на въвеждането на нови методи, е осезаем засиленият интерес по отношение на анализа на биоизображения, както ще стане видно от систематичния обзор на литературата, представен по-късно в настоящата монография. Дву- и тримерни изображения и видео могат да покажат поведенчески отклонения и патологични промени на организмово и органно ниво. Хистологичните изображения могат да покажат токсични изменения на тъканно и клетъчно ниво, а различните видове микрографии на изолирани или култивирани клетки могат да покажат клетъчни процеси, свързани с различните видове клетъчна смърт, както и биохимични токсични изменения на субклетъчно ниво.

Най-убедителен пример за икономическата ефективност на методите за анализ на изображения са тези от тях, които използват данни от най-обикновен светлинен микроскоп и дори не се налага закупуването на флуоресцентни или други маркери. Друго тяхно предимство е, че се избягва интерференция на флуорофора от една страна с моделната система, а от друга - с метода за измерване на биологичния отговор към съответното експериментално въздействие, например поради явленията гасене на флуоресценцията или светлинно-опосредствано избледняване на флуорофора.

Цел на монографията

Стимулът за написване на тази монография е наблюдението, че в почти всяка *ин витро* лаборатория са налице нужните материални условия за внедряване на методи за анализ на изображения, тъй като необходимата базова апаратура включва

само светлинен микроскоп с камера и компютър. Ситуацията в *ин виво* лабораториите е подобна, тъй като в контекста на протичащата масова дигитална трансформация на всички сфери на живота, цифровите камери с необходимите технически параметри за заснемане на животните са налични на цени, съпоставими с цените на някои рутинно използвани консумативи.

Основна цел на тази монография е да демонстрира ползите, произтичащи от приложението на методите за анализ на цифрови изображения в неклиничните токсикологични проучвания. Тя цели и да информира за нарастващата достъпност на въпросните методи, формулирани в софтуерни продукти със свободен и безплатен достъп, както и отличните обучителни ресурси, които обаче към момента или са фрагментирани и разпръснати в различни източници, или пък са написани на език, наситен с математическа и техническа терминология. В контекста на изложените по-горе аргументи, този текст цели поднесената информация в своята цялост да насърчи употребата на методите за анализ на изображения от заинтересованите страни.

Този труд акцентира върху логиката на методите за анализ на изображения и в по-малка степен върху подлежащата математическата теория. За да бъде онагледено приложението на описаните методи, е предложена батерия от няколко метода, които могат да бъдат безпроблемно внедрени в малка токсикологична лаборатория, снабдена с базово оборудване.

Въпреки че в момента масово навлизат бързи и удобни за употреба алгоритми за анализ на изображения с помощта на машинно обучение и дълбоко обучение, „ефектът на черната кутия“ или трудността да се обясни начинът, по който те класифицират информация, е препятствие пред надеждното им приложение върху големи масиви от разнородни изображения.

Стъпка в посока на разсейването на въпросната несигурност, е доброто познаване на присъщите характеристики на биоизображенията и възможностите и ограниченията на конвенционалните алгоритми за извличане на информация от тях. Освен това, машинното обучение и други подходи, свързвани със сборното понятие „изкуствен интелект“ (artificial intelligence, AI), все още не елиминират нуждата от конвенционални подходи за анализ на биоизображения, тъй като изискват по-голям изчислителен ресурс. Двата типа методики не са взаимоизключващи се, а напротив. Рационалната преценка кои стъпки от даден алгоритъм за анализ на изображения да бъдат възложени на конвенционалните методи, и кои на т.нар. изкуствен интелект, също изисква познаване на някои основни принципи като приложението на пространствени филтри, които са достъпно представени в труда.

Както често се случва в практиката, вероятно първоначалните опити за въвеждане на методи за анализ на изображения в дадена лаборатория ще бъдат частично успешни, което е възможно да провокира две различни линии на адаптация. Настоящият труд се стреми да увеличи вероятността за първата: 1) търсене на допълнителна информация за оптимизация на подходите, а не на втората: 2) загуба на интерес от последващото им приложение.

При досега на изследователи с нови интердисциплинарни области, какъвто е анализът на биомедицински изображения, първото типично затруднение е, че дискусиите по отношение на анализите започват на твърде ниско ниво, за да стимулират ясни отговори на научните въпроси, или пък са на твърде високо ниво, за да доведат до взаимно разбиране. Ето защо, сред целите на този труд е и да въведе изследователите в биомедицинската сфера в базовите концепции и понятия в областта на анализа на изображения.

С тези встъпителни думи не искам да оставя впечатлението, че анализът на биомедицински изображения е лесен. Характерно за биологичните моделни системи е, че са изключително вариабилни и съответно такива са и характеристиките на получените т.нар. биоизображения. Въпреки огромната палитра от мощни методи за анализ и обещанията на приложенията на AI, все още няма един единствен универсален метод, който да може да осъществи успешно едновременно всички анализи на всички видове изображения. Затова ролята на изследователя остава водеща.

Структура на изложението

Тъй като целта на тази монография е да помогне на изследователи в областта на експерименталната токсикология с никакъв или малко опит в анализа на изображения да придобият знания и да приложат успешно в практиката първите си протоколи, е използвана следната структура на изложението.

Първо са описани налични обучителни ресурси на български и английски език и след това - основните теоретични понятия, операции и концепции, необходими за осмисляне на наличния инструментариум.

След това, е представен систематичен литературен обзор, адресиращ петте „К“ („кой“, „какво“, „къде“, „кога“ и „как“, но не в точно този ред) по отношение на приложенията на подобни методи в токсикологията. По този начин, се очертават най-значимите тенденции в работата на експерименталните токсиколози, прилагащи анализи на изображения. Библиометричните данни са приведени като убедително доказателство, че анализът на изображения е ценен инструмент в изследователски звена с водеща научна роля.

Следващият раздел акцентира върху практически съображения. Представени са видовете налични софтуерни продукти, тенденциите при тях и някои съвети за избора на подходящ софтуер. Накрая, е предоставена батерия от избрани методи за анализ на биоизображения, изискващи само базова или широкодостъпна лабораторна обезпеченост с коментари за значението им по отношение на токсикологичните изследвания, особености на експерименталните протоколи и самите стъпки за осъществяване на анализите на получените изображения.

ТЕОРЕТИЧНИ ОСНОВИ

Типично, първите стъпки на изследователя, решен да въведе методика, свързана с анализ на биоизображения, се състоят в справка за налична информация по темата в интернет, резултатът от която е вероятно да провокира явлението „анализа - парализа“, или „парализа на избора“. Анализът на изображения като част от компютърното зрение е добре установена дисциплина[14] и изобилства от литература, посветена на теорията и практиката на анализа на цифрови изображения, засега предимно насочена към специалисти с инженерна подготовка (Таблици 1 и 2). Тази литература позволява задълбочено вникване в теоретичните принципи на алгоритми, придобили популярност в анализа на биоизображения[15].

Учебна литература на тема „Анализ на изображения“

Въпросната литература, състояща се от учебници, ръководства, монографии и дисертации (напр. в Таблици 1 и 2) може да послужи на по-запознатите с анализите на изображения като източник на идеи за внедряване и оптимизиране на методи, които към момента не са популярни за разрешаването на съответния практически проблем или пък за задълбочено вникване в най-често използваните методи, но не е съвсем удачна за въвеждане в тематиката на изследователи с преобладаваща биомедицинска подготовка и по-ограничена компютърна и математическа такава.

Литературата, насочена конкретно към приложната сфера на неклиничните изследвания не е толкова многобройна, но както

ще стане видно от следващия раздел, се наблюдава тенденция на промяна в това отношение. Откриват се както материали, въвеждащи теоретичните основи на прост, разбираем, нетехнически език[16], така и такива, насочени към предклинична методика с представяне на математическите основи[17]. Според нивото на техническа и математическа подготовка, някои от посочените източници в Таблица 2 могат да бъдат полезни наръчници при първите стъпки в материята. Мнозинството от представените в Таблици 1 и 2 източници, са откриваеми и в електронен формат.

Заслужава да се отбележи, че се откриват и редица източници на български език, посветени на теоретичните основи и някои приложения на анализа на изображения, които могат да послужат за справка и ценен ориентир в терминологията на български език (Таблица 1).

Сред тези източници липсват такива с практическа насоченост към неклиничните изпитвания, с частичното изключение на две монографии и няколко дисертационни труда, посветени на анализа на медицински изображения като рентгенови, компютърно томографски и ЯМР изображения. Справката не откри източници на български език, фокусирани върху анализа на микрографски изображения. Въпреки това, по отношение на теорията на AI и дълбоките невронни мрежи, към момента са налични отлично поднесени свободно-достъпни обучителни материали на български език[18].

Таблица 1. Българоезична литература, включваща ръководства, монографии, научни статии и докторски дисертации. С удебелен шрифт са представени материали с биомедицинска насоченост.

Източници на български език		
Година, Автор, Заглавие	Коментар	Област на приложение
Ръководства		
1996, П. Венков, Анализ и разпознаване на изображения и сцени [19]	Засяга всички основни теоретични принципи, вкл. невронни мрежи	Инженерни
1998, М. Петров и съавт., Въведение в компютърната обработка на медицински изображения [20]	**Фокус върху анализа на изображения в компютърната томография**	**Медицина, Диагностика, КТ**
1999, О. Железов, Л. Георгиев, Компютърна обработка на сигнали и изображения [21]	Ръководство за лабораторни упражнения на студенти от инженерни специалности	Инженерни
2014, Б. Маринов, Цифрова обработка на изображения [22]	Въведение в теория и терминология на достъпен език	Архитектура
2018, П. Малджански Близкообхватна фотограметрия и лазерно сканиране	Задълбочено представяне на теоретични основи, приложен акцент върху фотограметрията	Архитектура, Дронове
2022, К. Чавез, А. Фокнър, Adobe Photoshop CC: Официален курс на Adobe Systems [23]	Практически примери за приложението на основни операции (вкл. филтри) във Photoshop	Фотография, Софтуер
Монографии и помагала на български език		

2012, Т. Йосифов, Астрофотография с цифров фотоапарат[24]	Значение на оптичната система и приложението на (хардуерни) оптични филтри.	Астрономия
2014, М. Гълъбов, Съвременни технологии за обработка и визуализация на 3D изображения[25]	Акцент върху компютърната графика	Компютърна техника, Дисплей
2015, М. Гълъбов, Въведение в компютърното зрение[26]	Математически описания на теорията и раздел за видео	Инженерни
2019, Т. Петрова, Изследване и синтез на алгоритми за обработка на радиолокационни и оптични изображения с повишено качество[27]	Изразен акцент върху приложната част в софтуера за безпилотни летателни апарати (БЛА)	Инженерни, Авиация, Дронове (БЛА)
2023, Ф. Оджаков, Методи за определяне на дентална възраст - от традицията към изкуствения интелект: монография[28]	**Приложение на машинно обучение за класифициране на дентални изображения.**	**Съдебна медицина**
Избрани статии		
2018, А. Христов и съавт., Въведение в конволюционните невронни мрежи[29]	Достъпно поднесен обзор върху основните принципи	Компютърни науки
2019. М. Панайотов и съавт., Датиране на икони чрез анализ на изображения на дървени елементи заснети с цифров фотоапарат[30]	Насоченост към съответния практически проблем и не толкова върху теоретичните основи	Археология, Реставрация
Докторски дисертации		
1999, Б. Маринов, Приложение на цифровата обработка на изображения за автоматизиране на	Приложна насоченост към фотограметрия (снимки на земната повърхност)	Архитектура

технологични процеси във фотограметрията[31]		
2008, М. Панайотов и съавт., Многомерна цифрова обработка и анализ на последователности от изображения[32]	Описан е метод за идентифициране и анализ на движещи се обекти във видео/таймлапс	Видео охрана и наблюдение
2011, К. Иванова, Нов метод за анализ на съдържанието на изображения от картинни колекции, използващ семантиката на цветовете[33]	Акцент върху цветови схеми и теорията на възпроизвеждане и анализ на цвят	Изобразително изкуство
2011, С. Павлов, Ефект на променената тригеминална сетивност върху прорастването на аксонални колатерали, качеството на мускулната реинервация и възстановяването на координирани моторни функции след прерязване на лицевия нерв при възрастни плъхове	**Описано е приложението на морфологически оператори по отношение на конфокални микрографии на синапси.**	**Медицина**
2017, И. Кънев, FPGA – базирани линейни пространствени филтри[34]	Тестване и оптимизация на процеси, включващи употреба на пространствени филтри	Инженерни
2018, А. Михайлова, Алгоритми за автоматизирано сегментиране при голям брой медицински изображения[35]	**Описани са методи, приложими при сегментация на отделни органи в изображения от ЯМР и КТ**	**Медицина, Диагностика, Компютърна томография**

Очаквано, най-актуалната, достъпна и многобройна литература по темата е предназначена за международна употреба и се открива на английски език, под формата на публикувани в

интернет книги и ръководства (Таблица 2), както и онлайн курсове, дискусионни форуми, семинари, протоколи и видеа с теоретична и практическа насоченост към биоизображения (Таблица 3).

Към тях може да се подходи като към справочни материали за търсене и разясняване на нови протоколи, които да бъдат приложени за нуждите на неклиничната и токсикологична практика. Някои от тях са достатъчно подробни, така че да е възможно да се извлекат конкретни операции или цели протоколи, които могат да бъдат приложени чрез свободно-достъпните софтуерни продукти, представени в следващия раздел и евентуално, тествани върху собствени микрографии, или пък примерни такива от базите данни, представени в Таблица 3.

Таблица 2. Избрани ръководства и учебници на английски език, описващи теоретичните основи и практическите приложения на анализа на биоизображения конкретно.

Източници на английски език		
Година, Автори, Заглавие	Коментар	Област на приложение
Теоретични основи, Ръководства		
2009, R. Gonzalez, Digital Image Processing Using MATLAB, 2nd ed. [36]	Увод в теорията с примери с приложения на програмния език MATLAB (resp. Octave GNU)	Теория, Всички области
2012, J. Serra, P. Soille, Mathematical Morphology and Its Applications to Image Processing [37]	Математическата теория за боравене с формите на сегментираните обекти	Теория, Всички области
2018, J. Chaki, N. Day,	Обяснение и примери за операции с пиксели,	Теория, Всички области

A Beginner's Guide to Image Preprocessing Techniques [38]	филтри, сегментация, морфология	
2019, J. Chaki, N. Day, A Beginner's Guide to Image Shape Feature Extraction Techniques [39]	Математическо описание с примери за операции с характеристики за форма	Теория, Всички области
2022, Y.J. Zhang, A Selection of Image Analysis Techniques: From Fundamental to Research Front [40]	Опит за въвеждане както на базови, така и на задълбочени знания с приложни примери	Теория, Всички области
2022. W. Burger, M. Burge, Digital Image Processing: An Algorithmic Introduction [15]	Енциклопедичен труд с изчерпателни обяснения за прилагани алгоритми	Теория, Всички области
2022, A. Frery et al., SAR Image Analysis - A Computational Statistics Approach: With R Code, Data, and Applications [41]	Статистически основи и употреба на програмния език R за обработка на данните от радиолокационни изображения	Радиолокационни и сателитни изображения
Ръководства за анализ на биоизображения		
2008. S. Vollmer et al., Online learning Tool for Research Integrity and image processing [42]	12 групи правила, които е необходимо да бъдат спазени за коректен анализ на изображения	Приложна, Етика на научните проучвания
2019, K. Miura, N. Sladoje, Bioimage Data Analysis Workflows [17]	Практически примери за структуриране на алгоритми за разрешаване на специфични казуси в ImageJ и MATLAB	Приложна, Клетъчна биология
2020, R. Paulsen, T. Moeslund, Introduction to Medical Image Analysis [43]	Кратко, многопосочно описание на прост език с примери за ImageJ/Fiji, MATLAB, Python	Теория Диагностика, Микрография
2020, D. Koundal, S. Gupta,	Засяга и теми като дълбоко обучение и	Приложна,

Advances in Computational Techniques for Biomedical Image Analysis: Methods and Applications [44]	сигурност на съхранение на данни в контекста на конкретни приложения	Диагностика, Съдебна медицина
2020, M. Chen, Computer Vision for Microscopy Image Analysis [45]	Енциклопедичен труд с акцент върху дълбоко обучение за анализ на микрографски и клетъчни изображения	Теория, Приложна, Клетъчна биология, Патология
2023. P. Bankhead, Introduction to Bioimage Analysis [16]	Интерактивна онлайн книга с обяснения на прост език, ImageJ, Python	Теория, Клетъчна биология

Горепосочените източници биха послужили като първоначален ориентир за приложимостта и обхвата на наличните възможности за анализ на биоизображения и техните приложения. Въпреки това, поради големия обем налична информация, осъществяването на практика за пръв път дори на най-простите протоколи, и то на най-интуитивните софтуерни продукти, вероятно ще представляват известно затруднение, освен ако не бъде направена непосредствена практическа демонстрация от колега с опит. Предлагането и търсенето на видеоуроци в интернет към настоящия момент достига огромни мащаби. Самообучението по този начин се утвърждава като предпочитан подход, особено по отношение на хора, навлизащи в напълно непознати до този момент за тях професионални сфери. Така, представените в Таблица 3 онлайн ресурси биха могли значително да улеснят осмислянето на теоретичните основи и внедряването на нови протоколи. Видно е разнообразието от източници в интернет, към момента на написването на тази монография, въпреки че една малка част от тях са недостъпни (по отношение на директен достъп през браузър) от България.

Таблица 3. Обучителни онлайн ресурси на английски език, включващи актуализирани списъци с ресурси, платформи за споделяне на протоколи и биоизображения, курсове и практически насочени видео поредици (към януари 2024 г.).

Заглавие	Коментар	Линк
Списъци с ресурси		
ImageScience.org	Подробен, разностранен, много изчерпателен. Може да се наложи прокси достъп.	https://imagescience.org/
Bioimage Informatics Index (на NEUBIAS)	Най-актуалните подходи с примери и практически-приложими материали	https://biii.eu/
Платформи за споделяне на алгоритми и разискване на въпроси		
Image.sc	Най-активният форум по темата	https://forum.image.sc
c4science.ch	Място за споделяне на материали, алгоритми, напр. макро код за софтуера Fiji (ImageJ)	https://c4science.ch/w/bioimaging_and_optics_platform_biop
Онлайн университетски курсове		
EPFLx: Image Processing and Analysis for Life Scientists, EdX, École polytechnique fédérale de Lausanne	Увод в основните принципи на анализа на биоизображения с практически фокус върху софтуера imageJ/Fiji – 21 часа	https://www.edx.org/learn/image-analysis
Image and Video Processing: From Mars to Hollywood with a Stop at the Hospital, Duke Uni	Увод в основните принципи и акцент върху видео-изображения – 21 часа	https://www.coursera.org/learn/image-processing

Digital Image Processing, Northwestern University	Увод в основните принципи в малко повече детайли и математическа теория, в сравнение с горепосочените два курса – 35 часа	https://www.coursera.org/learn/digital
EECS 442: Computer Vision, курс към Университета в Мичиган	Акцентира на приложението на AI. Съдържа видеа (трябва да се изпрати заявка за достъп към google drive) и директно налични учебни материали и практически задачи	https://web.eecs.umich.edu/~justincj/teaching/eecs442
Image Processing and Computer Vision, курс към Университета в Амстердам	Учебни материали от университетския курс за 2018 г. в контекста на програмиране с Python	https://staff.fnwi.uva.nl/r.vandenboomgaard/IPCV20172018/index.html
YouTube канали		
Imaging in Biology, Anne Carpenter& Kevin Eliceiri	Лекционен курс върху основните теоретични понятия и практически операции, специфични казуси и приложения	@iBiologyTechniques
Лекции BioImage Analysis 2020, Robert Haase	Лекционен курс, въвеждащ най-важните теория и софтуерни инструменти	@haesleinhuepf
Fiji Is Just ImageJ, Neil Anthony	Серии от практически демонстрации с протоколи и алгоритми на ImageJ/Fiji, ilastik, CellProfiler и др.	@nophotonleftbehind7352
Презентации на NEUBIAS - Network of European Bioimage Analysts	Пълни записи на семинари с практическа насоченост, актуални методи с по-широк набор от софтуерни инструменти	@NEUBIAS
Презентации на COBA: Center for Open Bioimage Analysis	Известно припокриване с @iBiology Techniques, но включва записи от допълнителни практически семинари	@cobacenterforopenbioimagea1864

Курс на университета в Бирмингам, Wolfson Bioimaging Facility	Увод в програмирането на macro езика за алгоритми във ImageJ/Fiji с материали за упражнения в GitHub	@wbif-bristol https://github.com/wbif-bristol
Лекции на Sreenivas Bhattiprolu, Zeiss	Увод в програмирането на Python за целите на анализа на микрографии, широк набор от подходи, свързани с приложенията на Python	@DigitalSreeni https://github.com/bnsreenu/python_for_microscopists
Практически примери за анализи, показани от Johanna M. Dela Cruz	Видеоинструкции за операции с изображения от оптична микроскопия във ImageJ/FIJI и QuPath	@johanna.m.dela-cruz
Бази данни с примерни биоизображения		
Cell tracking challenge	2D и 3D таймлапс серии от микрографии на ярко поле, фазово-контрастни и флуоресцентни, на различни клетъчни типове	http://celltrackingchallenge.net
The Image Data Resource (IDR)	384 TB от над 12 млн. разнородни микрографии	https://idr.openmicroscopy.org
Cell Image Library	12 000 серии от изображения или общо около 30 TB	http://www.cellimagelibrary.org/home
Broad Bioimage Benchmark Collection	Серии от разнородни снимки, използвани за валидиране на CellProfiler.	https://bbbc.broadinstitute.org/image_sets
The cell image analysis archive	Фазово-контрастни изображения на миобластни стволови клетки	https://doi.org/10.17605/OSF.IO/YSAQ2
Mitosis detection in breast cancer histological images	H&E оцветени слайдове с проби от рак на гърдата	http://ludo17.free.fr/mitos_2012/index.html

Свойства на цифровите изображения

Познаването на инфраструктурата на наличните свободнодостъпни обучителни ресурси с теоретична и практическа насоченост е предпоставка изследователят да оборудва методологичната си „кошница“ със софтуерни инструменти. С тяхна помощ могат да бъдат изградени аналитични потоци, които преобразуват експерименталните биоизображения в ясно структурирана информация, а след това, и в биологични прозрения.

Оптималният избор на инструменти, изисква разбиране за особеностите и характеристиките на заснеманите обекти, за това как е получена и съхранена в цифров вид визуалната информация и ограниченията, свързани с това.

Резолюции

Предпоставки за получаване на изображения с подходяща разделителна способност

При заснемане на обекта, светлината, отразена или излъчена от него и обкръжението му преминава през оптичната система на микроскопа/фотоапарата/камерата, на изхода на която се проектира изображението, попадащо върху фотоматрицата. Там, проекцията се преобразува в електрически сигнали спрямо вида и интензитета на светлината, попадаща върху всеки сензорен елемент. Въпросните сигнали се преобразуват в числови стойности, служещи за да се генерира растер от пиксели (цифрова матрица), който може да бъде анализиран и/или преобразуван отново във визуални характеристики спрямо цветова схема (указваща цвета и интензитета на всяка стойност

на пикселите) и представен на екран. Всеки един от тези етапи е определящ за качеството на цифровото изображение.

Разделителна способност (резолюция)

Разделителната способност, или резолюцията е най-важният показател по отношение на качеството на биоизображенията, подлежащи на компютърен анализ. Тя представлява способността визуално да се различат две съседни точки в изображението. От нея зависи размера на най-малките детайли, които са различими в изображението. Например, ако най-малкото разстояние между две точки, преди очертанията им да се размият, припокрият и започнат да изглеждат като един обект е 1 μm, това е и стойността на резолюцията. Тя зависи от характеристиките на светлината, средата на разпространението ѝ, разделителната сила на обектива, характеристиките на фотоматрицата, форматирането на записаното цифрово изображение и екрана за визуализация. На практика, понятието резолюция се използва по отношение на всички тези концепции, определящи качеството на изображението. Те са взаимосвързани, но не и идентични.

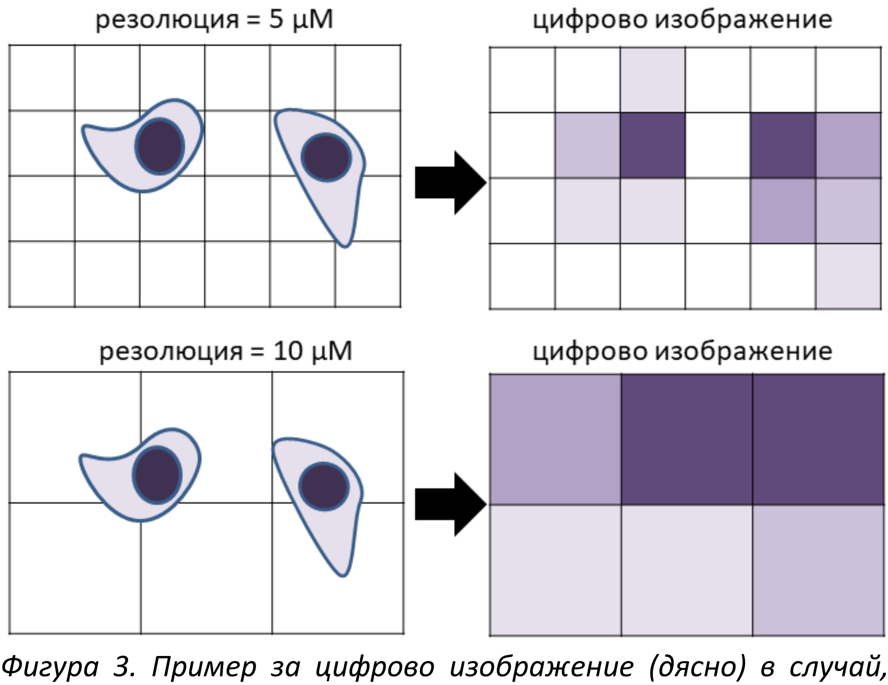
От момента на запазването на изображението в цифров, растерен вид, неговата резолюция е пропорционална на броя на пикселите, или елементите на матрицата, в които е поместена визуалната информация[46]. Въпреки това, най-непосредственият елемент, от чиято резолюция ще зависи качеството на детайлите в наблюдавана на екрана микрография, е броят отделни точки (пиксели), изграждащи елементите на самия екран. Ако изображението е изградено от малък брой пиксели, но е представено на екран с голяма разделителна способност, най-малките детайли, които можем да разграничим, ще зависят от резолюцията на самото изображение, а не на екрана. В противоположния случай, ако представим много голямо

изображение на малък екран, наблюдаваните детайли ще бъдат сведени до резолюцията на екрана, с уточнението, че това ограничение може да бъде донякъде преодоляно, като части от изображението бъдат поотделно увеличени (zoom in) и визуализирани. Въпреки че може да окаже влияние върху преценката на оператора, разделителната способност на екрана няма отношение към самите алгоритми за анализ на изображенията, които за целта се разглеждат единствено като числови матрици.

Когато говорим за анализ на изображения, под разделителна способност най-често се има предвид именно броят пиксели, изграждащи матрицата на изображението. Функционалният брой пиксели (които носят значима информация за заснетите обекти) в цифровите изображения е пряко свързан с броя и качеството на работещите елементи във фотоматрицата и с качеството на проектираните върху тях образи. Препоръчително е винаги да се запазва оригиналното, непреработено изображение, тъй като при почти всички операции върху цифрови изображения се губи част от информацията, дори това да не е очевидно. Най-простият пример е, че при свиване на изображението, при което оригиналната информация се вмества в матрица с по-малък брой пиксели, разделителната способност по правило ще бъде намалена, освен ако изображението не е било предварително разтеглено в определени пропорции. Ако броят на пиксели в изображението бъде изкуствено увеличен чрез разтягането му по хоризонтала и вертикала, това няма да ни помогне да разграничаваме по-малки детайли, защото визуалната информация, която бива съхранена няма да надхвърли отчетената от елементите на фотоматрицата.

Достатъчен брой пиксели за изобразяване на обект

Правилото за минималния брой пиксели, които са необходими за изобразяването на обект, е формулирано в теоремата на Shannon-Nyquist[47–49]. То засяга въпроса върху колко работещи елемента на фотоматрицата (и колко съответстващи пиксела в полученото изображение) трябва да бъде проектиран образа на даден обект, за да бъде разграничим при формирането на цифров от аналогов сигнал. Теоремата гласи, че честотата на дискретизация (брой зензорни елементи на фотоматрицата за единица площ) трябва да бъде най-малко два пъти по-голяма от честотата на отчетения сигнал (площ, заета от проектираните образи на най-малките обекти, които ни интересуват) (Фигура 3).



Фигура 3. Пример за цифрово изображение (дясно) в случай, когато проектираните образи на две отделни клетки са с размери, сходни с размерите на едно (долу) или на две полета

(горе) от фотоматрицата (ляво). Адаптация по Pawley et al (2006)[50,51].

В противен случай, в полученото изображение два обекта може да бъдат погрешка идентифицирани като един. Припокриването на размитите граници води до загубата на част от визуалната информация и е възможно да се проявят артефакти[52], като изкривявания в повтарящи се мотиви, от типа алиасинг[53]. Може да се приеме, че теоремата на Shannon-Nyquist задава само минимално изискване бъде видим обекта, но не гарантира ясното представяне контура му и различаването на обекти с еднакви размери, но различна форма.

Емпирично-установеното правило, за да бъде обектът с достатъчно разграничими контури и с разпознаваема форма е, че очертанията му трябва да се вместват в зона, широка поне 5-10 пиксела. Рисковете при представяне от по-малък брой пиксели е, че ако очертанията на обекта попадат между два детекторни елемента, респ. два пиксела, то стойността ще е разпределена между тях и видимо границите на обекта ще бъдат по-бледи, но разширени до тези на външния ред пиксели (Фигура 3).

Избор на оптично увеличение на микроскопа

Дори фотоматрицата да има огромен брой елементи, ако генерираните от оптичната система проекции на обектите са с неясни очертания и са неразграничими, то те ще са такива и в получения растер. Въпреки многобройните пиксели, обектите ще са с неясни и неразграничими очертания.

В ежедневната практика, най-често за да разгледаме под микроскоп определен обект в повече детайли, прибягваме към обектив с по-голямо увеличение. Видът обектив определя от една страна мащабите на детайлите, които искаме да бъдат ясно разграничими, а от друга, желания обхват и брой обекти, които

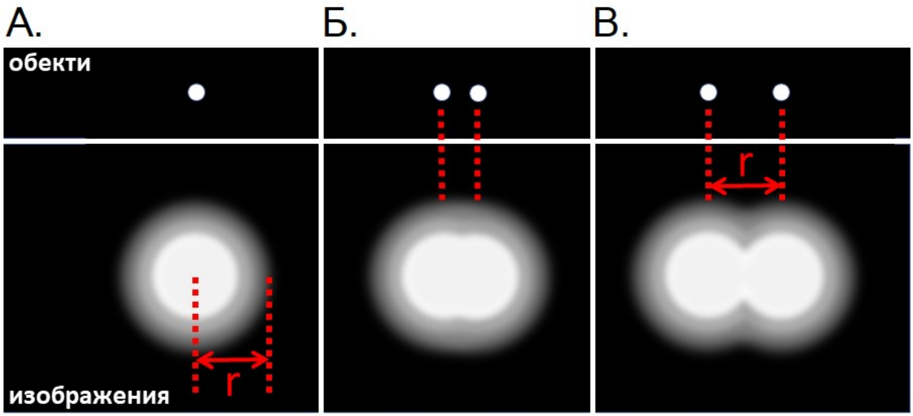
да се намират в зрителното поле. Изборът на обектив изисква каква степен на детайли ни е достатъчна, за да отговорим на поставения научен въпрос. Ако е нужно в да бъдат фотографирани едновременно повече от един обекти, следва да сме наясно и с обхвата на зрителното поле и нужните ни брой, гъстота и хомогенност на разпределението на обектите в пробата. Така, оптималният баланс между резолюция и обхват на зрителното поле ще е свързан не само с избора на обектив, но и с особеностите на пробоподготовката. Разбирането, че по-голямо увеличение е свързано и с по-добро представяне на детайлите е интуитивно, но подобна корелация не е задължителна[54]. Обикновено, обективи с по-голямо увеличение имат и по-голяма числова апертура (numeric aperture, NA). Всъщност, тя е незаобиколимият фактор по отношение на разделителната способност, а не увеличението само по себе си. NA е мярка за максималният ъгъл, под който светлината може да попадне в обектива. Обектив с по-голяма NA събира светлина, разсеяна под повече ъгли и позволява да се получи по-ясен и фокусиран образ. Освен от обектива, NA зависи и от рефракционния индекс на средата, в която се разпространява светлината от обекта до достигане на лещата на обектива.

В стандартната светлинна микроскопия, разделителната способност е ограничена от закона за дифракцията. Дифракцията се проявява като отклонение (разсейване) от праволинейното разпространение на светлината, когато премине покрай препятствие, или малък отвор. Размитите очертания на образа и наблюдаваните в някои случаи концентрични пръстени около образите на много малки или отдалечени обекти, са резултат на това явление[55]. Начинът, по който бива трансферирана светлината от източника ѝ до проектираните образи в изображението зависи от вида светлина и устройството на оптичната система и може да бъде моделиран чрез т.нар. функция за разсейване на точка (point spread function, PSF)[56]. Начинът, по който малките обекти във Фигура 4 биват

проектирани в съответните им микрографски изображения, може да бъде изразен с PSF, присъща за конкретна оптична система. Като правило, с увеличаване на NA се изменя и PSF, в посока формиране по-малка точка с по-ясни и остро очертани граници.

Физически ограничения на разделителната способност - Критерий на Rayleigh

Разстоянието, под което два безкрайно малки източника на светлина не могат да бъдат разграничени и ще изглеждат като един зависи от разсейването (дифракция) на светлината и NA. Степента на дифракция зависи от дължината на вълната (напр. цветове с по-малка дължина на вълната, като син и зелен ще



Фигура 4. Схематично представяне на изображения (долу, големи квадрати А., Б., В.) на реалните очертания на един (горе, правоъгълник А.) или два малки обекта (горе, правоъгълници Б. и В.) на разстояние по-малко от разграничимото (Б.) или колкото е разграничимото r, съпоставимо с радиуса на диска на Ейри (В.).; D-разстояние между централните точки на двата обекта. Адаптирано по Wiklund et al. (2012)[57].

имат по-малка дифракция и по-добра разделителна способност, в сравнение с червен). На базата на познания за дифракцията и числовата апертура, чрез критерия на Rayleigh[57,58], може да бъде изчислено разстоянието между два обекта[59], под което очертанията им ще се припокриват и ще изглеждат като един, и обратно, над което, ще могат да бъдат разграничени визуално (Фигура 4). Според това правило, резолюцията може да се изчисли по формулата:

$$r = \frac{0.61\lambda}{NA}$$

където r е резолюцията, или дистанцията при която два обекта са различими, λ е дължината на вълната, а NA е числовата апертура. Това разстояние отговаря приблизително и на радиуса на светлия диск, дължащ се на дифракция (диск на Ейри)[60].

Това ограничение е свързано с вълновите характеристики на светлината и няма отношение към разделителната способност на фотоматрицата. Резолюцията ще е лимитирана от най-слабото звено, освен ако не се извършат допълнителни трансформации на полученото изображение или подходи за супер резолюция[61]. Така, резолюцията на микрографията ще зависи от зеното с най-слаба резолюция – оптичната система, фотоматрицата или софтуера за дискретизация и квантуване.

Подходи за увеличаване на резолюцията

Резолюцията може да бъде подобрена като се използва източник на светлина с по-малка дължина на вълната. максималната постижима резолюция с червена светлина (λ = 650 nm), ще е около 340 nm, за зелена светлина (λ = 550 nm), около 290 nm, а за синя светлина (λ = 450 nm), около 240 nm[62]. Това може да бъде приложено към избора на флуоресцентно багрило.

Тъй като NA зависи от рефракционния индекс на средата между пробата и обектива, със стандартните обективи, при които има въздушен слой, обикновено може да се постигне максимална NA около 0.95. Ако се разшири ъгълът на попадналата в обектива светлина и по този начин и стойностите на NA, ще се повиши и резолюцията[63]. С помощта на т.нар имерсионни обективи, между пробата и обектива се накапват специални масла с по-висок рефракционен индекс от въздуха и така могат да се достигнат стойности на NA над 1.3, а в някои случаи, дори 1.7. Ако при светлина с $\lambda = 525$ nm и NA= 0.95 се достига резолюция от 337 nm, то при увеличаването на NA до 1.4, резолюцията стига до 229 nm[64].

Освен конвенционалната микроскопия на широко поле, се прилагат и по-сложни, специални оптични системи, при които може да бъде постигната резолюция отвъд дифракционната граница[65] и критерия на Rayleigh. Например, при конфокалната микроскопия[66], светлинният източник е лазер, чиято светлината се насочва само в равнината на наблюдение и с помощта на малка апертура се елминира разсеяната светлина и шума от зони, които не са на фокус. По този начин голяма част от светлината бива елиминирана, и е необходима по-дълга експозиция. Чрез сканирането (обхождане) на различни зони и равнини, конфокалната микроскопия позволява изграждането на качествени триизмерни (3D) изображения и резолюция от около 200 nm[67]. Подобна разделителна способност има и мултифотонната микроскопия (multophoton microscopy, MPM), която постига още по-прецизно насочване на лазера в една точка, без да е необходимо да се прилага допълнителна апертура за елиминиране на разсеяната светлина. Тя е особено подходяща за генериране на 3D изображения в срезове с по-голяма дълбочина (над 100 µM), в сравнение достижимата за конфокалната микроскопия[68]. Друг подход да се елиминира странична светлина, е като лазерът се насочи към пробата под такъв ъгъл, че поради пречупването на свелината при

навлизането в пробата, да бъде осветен единствено много тънък слой от повърхността, без да се засягат подлежащите слоеве. Това се прилага при техниката флуоресценция с пълно вътрешно отражение (total internal reflection fluorescence, TIRF). Тя позволява резолюции под 100 nm и е подходяща в случаи, когато наблюдаваните структури са разположени в тънък слой на повърхността на пробата[69,70].

Други специални техники, преодоляващи дифракционната граница, са методите за оптична наноскопия и постигане на супер резолюция. Употребата им все още е по-ограничена в сравнение със споменатите до тук техники. С тях могат да бъдат постигнати резолюции от порядъка на няколко десетки нанометра[71]. Такива са микроскопите със симулирано изчерпване на емисията (stimulated emission depletion, STED)[72], със структурирано осветление (structured illumination microscopy, SIM)[73], фотоактивираните локализационни микроскопи (photoactivated localization microscopy, PALM)[74], стохастичните оптични реконструктивни микроскопи (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)[75], микроскопите с изчерпване на флуоресцентната емисия (fluorescence emission difference, FED)[76] и др.

Има подходи на базата на дълбоко обучение, т.нар. супер резолюция, с чиято помощ може изкуствено да се повишави резолюцията на вече заснетото изображение. Използва се контекстуална информация, като контури, фон и др., за да се получат производни изображения с видимо подобрено качество[77]. Важно е да бъдат взети предвид ограниченията на този подход. Добавените детайли са генерирани от модел, предварително обучен върху примерни изображения и в същността си са прогнози, които дори да са много добри, не са базова истина и зависят от обучителния комплект изображения. Освен ако прилаганите модели не са стриктно валидирани, е

вероятно да не бъде идентифициран определен детайл, или пък да бъде добавен детайл, който липсва при заснетия обект[78].

Дълбочина на пикселите

Стойностите, които може да приемат пикселите при заснемане на изображение по правило са цели (квантуване) и принадлежат на скали с определен обхват (дискретизация). Освен броя пиксели, значение за качеството на изображенията и точното представяне на обектите в тях, имат именно въпросните скали, или тяхната дълбочина (обхват, брой различни стойности, които могат да заемат). Въпреки че повечето дефиниции за резолюцията, като мярка за разграничаване на детайли, акцентират на броя пиксели, а не на дълбочитата им, лесно може да се докаже, че тя оказва влияние. Ако изображението е с малка дълбочина, то пикселите ще могат да заемат малко на брой стойности и съответно, ще представят малък брой нюанси. Обратно, при голяма дълбочина, ще е възможно да бъдат представени нюанси на интензитета/цвета. Въпреки че с типовете изображения с голяма дълбочина това е възможно, не е задължително да бъде използван целият диапазон от нюанси. Използваният диапазон се нарича „динамичен обхват“ (динамичен диапазон, dynamic range)[79]. Той зависи освен от условията на заснемане и обекта, и от настройките на оптичната система и фотоматрицата. Изображенията с голяма дълбочина не е задължително да имат голям динамичен обхват, но при типовете изображения с малка дълбочина на пикселите, е непостижим.

Освен че всеки пиксел в матрицата може да заема определен набор от стойности, възможностите за съхранение на информация в пикселите могат да бъдат допълнително разширени, като, образно казано, бъдат насложени една върху друга, като пачка, повече от една матрици с идентични

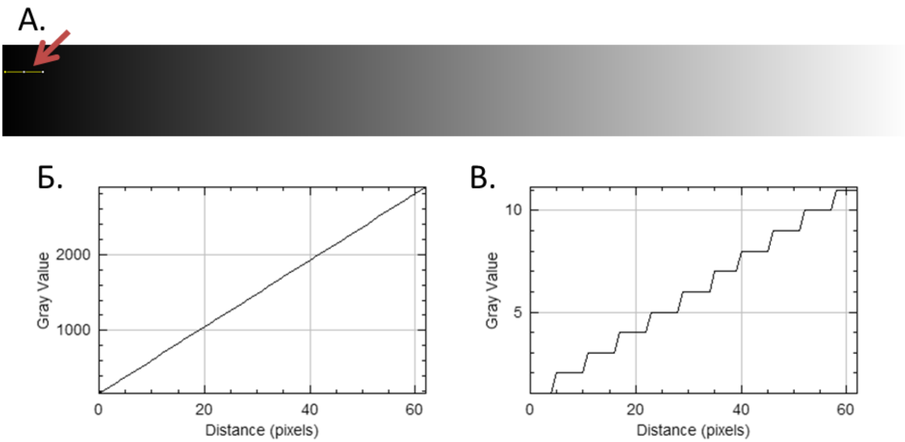
координати. Тогава, за пиксел с определени координати, близначните пиксели в останалите матрици от пачката ще могат да съхраняват различен вид информация (друг цвят, флуоресценция или дори мас спектър). Според дълбочината съществуват различни типове цифрови изображения, като най-често използвани за анализ на биоизображения са:

Бинарни, или 1-битови. Ако изображението е бинарно (едноцветно, най-често представяно като черно-бяло), всеки пиксел може да заеме само 2^1 стойности – 0 и 1. С 0 обикновено се представя липсата на отчетен интензитет, или черен цвят, а с 1 – максималният интензитет, или бял цвят. Дали светлина с определен интензитет ще надвиши физическия или условно зададен праг, за да бъде отчетена и кодирана като 1 в изображението, зависи от чувствителността и настройките на фотоматрицата или критерият за бинаризиране (сегментиране) на оригинално изображение с много нюанси до черно-бяло. Бинарните изображения са удобни за идентифициране на обекти и често се създават като междинни производни изображения, за да позволят идентифициране на контурите на обекти в оригиналното изображение. Функционалността им за тази цел се дължи на ясно откроените граници между обект (бял) и фон (черен) при тях. На практика, бихме могли да използваме и 2-битови изображения, при което скалата ще приема 2^2 или 4 възможни стойности. Тогава, освен черно (0) и бяло (3), ще е възможно да се представят и още два нюанса, светлосив (1) и тъмносив (2). Това обаче, не е популярен тип представяне по отношение на анализа на биоизображения, понеже от една страна, се губи предимството на недвусмисления контур при бинарните без, от друга страна, се постига значителна резолюция, осъществима чак при 8-бита дълбочина.

8-битови. Приема се, че чрез 8-битово изображение (2^8 или 256 нюанса, един байт за пиксел) се постига достатъчна дълбочина за визуално изобразяване, докато се заема сравнително малко

компютърна памет. Когато е необходим количествен анализ обаче обикновено са предпочитани изображения с дълбочини от порядъка на 16 бита, тъй като дават по-голяма прецизност и е малко вероятно да бъдат „отрязани“ (clipping) много ниски или много високи стойности на интензитета.

16-битови. 16-битовите изображения позволяват в изображението да бъде записана много повече информация (2^{16} или 65 536 стойности). Ако съпоставим едно 16-битово изображение с негово идентично, но 8-битово копие, разликата между тях ще е незабележима с просто око. Ако обаче измерим интензитетите на пикселите върху линия с



Фигура 5. Градиент на сивия цвят (А). При генерирането му като 16-битово, е измерен профила на интензитетите (ордината) по дължината (абсциса) на линейна селекция в обсега на най-нисък интензитет (жълта линия горе вляво, посочена с червена стрелка) преди (Б.) и след преобразуването на изображението в 8-битово (В.). Изображението и профилите са създадени в софтуера FIJI.

еднакви координати тези две изображения, ще забележим, че пиксели с различен интензитет в 16 битовото изображение

(Фигура 5 Б.) биват представени като пиксели с еднакъв интензитет в 8-битовото (Фигура 5 В.), което се наблюдава като наличие на плата по продължение на градиента.

32-битови RGB. Както името подсказва (червен - red, зелен - green, син - blue, RGB), тези изображения съдържат три канала за интензитета на трите основни цвята. Каналите за всеки отделен цвят са 8-битови, като съставляват общо 24 бита (3 × 8) и само с тях могат да бъдат постигнати 16 777 216 различни цветни комбинации. Черният цвят обикновено ще съответства на 0 във всеки от трите канала, а белият – 255 във всеки от трите канала. Останалите 8 бита (за достигане на 32) обикновено се използват за т.нар. „алфа" канал, кодиращ информация за нивото на прозрачност, който обикновено няма отношение към функционалните характеристики на типичните микрографии. Въпреки това, той подобрява вида на градиенти и светлосенки, особено за целите на графичния дизайн и анимацията и може да влезе в употреба, ако се налага да се насложат едно върху друго две или повече изображения за целите на визуализацията.

32-битови монохромни. За разлика от RGB, съдържат само един цветен канал и позволяват дълбочина на пикселите, значително надвишаваща тази на 8- и 16-битовите изображения. С тяхна помощ се преодолява ограничението пикселите да съдържат само цели числа. За разлика от 8- и 16-битовите изображения, те могат да съхраняват дроби (включително числа с десетична запетая) и да заемат отрицателни стойности. Това има значение за анализи, които изискват изчисления като коренуване или операции с отрицателни стойности. Резултатите от тези анализи могат да се запишат в 32-битово изображение.

Композитни (съставни многоканални) – Те могат да са изградени от множество канали (два, три и повече), които могат да бъдат 8- или повече битови и да съдържат информация за различни цветове, които не е задължително непременно да

бъдат червен, зелен и син. Могат да се използват за съхранение на различни типове информация като флуоресцентни[80], и едновременно с това, други канали като фазово-контрастен[81], масспектрометричен[82], пространствено транскриптомен[8,9] и др. Този вид изображения са удобни при анализи за колокализация[83].

Преобразуване на изображенията от един в друг вид с различна дълбочина на пикселите и цветните канали крие рискове от загуба на информация.

Ако преформатираме едно 8-битово монохромно изображение, намалявайки дълбочината му до 1-битово (бинарно, два възможни нюанса), то всички пиксели от 8-битовото изображение със стойност над средния интензитет или друга условно зададена от нас гранична такава, в производното бинарно изображение ще бъдат представени с бял цвят (1), а останалите, с черен цвят (0). При това, ако в 8-битовото изображение са заснети два леко разфокусирани, едва разграничими близки обекта с размити граници, в бинарното изображение е много вероятно да бъдат необратимо обединени в един по-голям обект, понеже постепенното избледняване на интензитетите на пикселите с отдалечаване от най-наситените централни точки на двата обекта ще бъде заменено с един цвят. Обратното преформатиране на бинарното изображение в 8-битово няма да възстанови вече изгубената информация за нюансите и обектите няма да бъдат повторно разграничими. Това показва, че не само броят елементи във фотоматрицата и оптималният брой пиксели в изображението са определящи за качеството му, но и чувствителността и прецизността на всеки неин елемент, който има отношение към динамичния обхват и дълбочината на изображението. Ако елементите на фотоматрицата са слабо чувствителни и могат да идентифицират само четири нюанса (2 бита), запазването на отчетените четири различни стойности в 8-битово изображение няма да доведе до

ефективно увеличаване на качеството на цифровото изображение.

При цветови трансформации също може да бъде загубена информация. Комбинирането на отделни изображения или отделни канали от композитно изображение, в RGB изображение ще доведе до загуба на информация за интензитетите на отделните канали. При трансформацията съотношенията между цветовете ще бъдат преизчислени, за да се впишат в RGB каналите. Няма да бъде изгубена цветова информация единствено ако поначало композитното изображение е изградено от канали, съдържащи напълно изчистени и непримесени нюанси на червен, зелен и син цвят.

Шум

Всички описани дотук съображения за получаване на качествени изображения са разгледани в една идеална ситуация, в която полученият цифров растер идеално възпроизвежда проектираните от оптиката образи, били те и неясни. В реалната ситуация обаче сигналът винаги е примесен с определени нива на т. нар. „шум“. Той обикновено се проявява със случайни и равномерно разпределени отклонения в стойностите на сигнала, които придават на изображението „зърнист“ вид. Основните източници на шум са свързани или с потока от попадащи върху фотоматрицата фотони (фотонен шум), или с количеството генерирани в резултат електрони във фотоматрицата (шум при отчитане). Доколко шумът ще се отрази на качеството на изображението, зависи от съотношението сигнал към шум. Основен подход за намаляване на шума е отчитането на повече фотони. Особеностите на видовете шум, подходите за намаляване на влиянието му и изборът на подходящ вид фотоматрица е резюмиран от Bankhead (2023)[16].

Размери

Добавяне на допълнителни измерения (пачки и хиперпачки)

Типичните двумерни изображения имат координати за x и y, определящи разположението и формата на заснетите обекти. Ако заснемем същото изображение, но в RGB формат, цветът, съответстващ на всеки пиксел ще се определя от три отделни стойности за интензитета на червения канал, на зеления канал и на синия канал. Наличието на повече от един канал предполага принадлежността на всяка стойност да бъде недвусмислено определена с добавяне на координат (освен x и y) с три възможни стойности (за всеки от трите цветни канала), т.е. изображението добива ново измерение. Няма ограничения за вида информация, която може да се съдържа в допълнителните измерения. При групиране на растерните матрици в пачки (stacks), структурата на новосформираната координатна система следва да бъде недвусмислено указана. Така, всяка стойност в който и да е слой ще може да бъде идентифицирана чрез уникалните си x, y, z или други координати. Освен цветни канали, най-често прилаганите допълнителни измерения са пространствено (z) и времево (t).

Ако разстоянията между два съседни пиксела в равнината (x y) на 3D микрография е различно от това между прилежащите пиксели в съседни срезове (z), изображенията се наричат анизотропни, а ако е еднакво - изотропни. По-често изображенията биват анизотропни. Голяма част от операциите върху 3D изображения ще следват същата логика като операциите с двумерни изображения. Някои операции, особено включващи неделими 3D филтри, ще изискват голям изчислителен ресурс и за предпочитане ще са паралелните изчисления чрез графичен процесор[16].

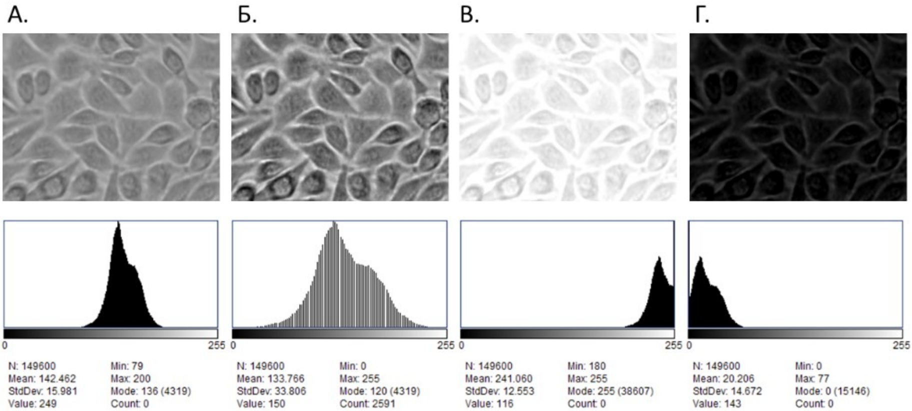
Макар да звучи контраинтуитивно да говорим за 5-измерни обекти в ежедневната си практика, това не е толкова необичайно за целите на анализа и визуализацията. Композитно изображение с повече от един цветен канал, може да бъде съхранено като пачка от растери с широчина x и височина y. При добавяне на информация от различни равнини/дълбочни/срезове снимките могат да добият допълнително, пространствено измерение (z), което е характерно за томографските изображения. Ако добавим повече от три измерения, получените пачки от пачки, се наричат хиперпачки[84]. Например, към 3D изображението, допълнително може да се добави и времево измерение (t) чрез повторно му заснемане през определени времеви интервали. Резултатът е 3D видео или time lapse (заснемане през големи времеви интервали, като в резултатното видео бавно-настъпващи процеси изглеждат силно забързани).

Можем да продължим да добавяме допълнителна информация за заснетите обекти, като обогатяваме координатната система с още измерения, като общото правило е при всяко допълнително измерение да се умножават всички съществуващи хиперпачки по броя стойности на новия координат. Визуалното поле на микроскопа е ограничено и обратнопропорционално на увеличението. Това ограничение може да бъде преодоляно с помощта на моторизирана стойка за автоматизирано заснемане. За нуждите на дигиталната патология биват заснемани множество припокриващи се съседни зрителни полета, които цифрово се напасват и сглобяват в изображение (мозаечно, tiled), представящо повърхността на целия хистологичен слайд. Подобни изображения позволяват да се запише информация, обхващаща много нива: органово, тъканно, клетъчно и субклетъчно. При такъв обем от информация, размерите на типичното изображение са от порядъка на няколко гигабайта[85,86]. В тези случаи е удачно да се използват пирамидни изображения (Фигура 7).

При възможност за автоматизирано заснемане в многоямкови плаки, може в изображението да се добавят и метаданни, свързани с условията на третиране, които ще улеснят интегрирането в анализа на данни от други видове тестове, които да допринесат за по-широкия контекст на анализа с помощта на многопараметрични методи[87]. Размерът на изображение, изградено например от малък брой пиксели с 8 бита дълбочина, при добавяне на няколко флуоресцентни канала, изображения от многоямкова плака, както и видео, може лесно да достигне размер от няколко терабайта.

Намаляване на измеренията за целите на визуализацията

Обобщено представяне чрез хистограма. Хистограмата показва броя пиксели (ордината) с определен интензитет (абсциса). Чрез нея можем бързо да се ориентираме за разпределението на интензитетите на пикселите в n-измерни изображения. Въпреки че пренебрегва пространственото разположение на пикселите, хистограмата дава важна информация за условията на заснемане на снимката, например дали е била изсветлявана (Фигура 6 В.), потъмнявана (Фигура 6 Г.), дали са променяни контрастът и яркостта (Фигура 6 Б,), каква е била светлинната експозиция и има ли свързани с това артефакти.



Фигура 6. Хистограми (долен ред) на фазово контрастна микрография (горен ред) в оригиналния си вид (А), след корекция на максимална и минимална стойност (Б), след прекомерно повишаване на яркостта (В) или понижаване на яркостта (Г). Микрографията е заснета в ин витро лабораторията на Секция по Токсикология и представя миши фибробласти L929, а хистограмите са генерирани с ImageJ/FIJI[88,89].

Ако се наблюдава изместване на основната фракция пиксели в десния край, отговарящ на най-големите интензитети, тогава вероятно снимката е била свръх експонирана (изсветлена) при заснемане или след това е коригирана яркостта ѝ, като и в двата случая се губи част от информацията за детайлите в „отрязаните“ най-ярки части на изображението (Фигура 6 В.). Същото е валидно и в обратния случай, когато няма достатъчно светлина при заснемане, или пък след това яркостта е намалена прекомерно (Фигура 6 Г). Единственият начин да бъде възстановена липсващата информация е чрез повторно заснемане.

Ако има голям брой пиксели на минималната стойност или широки интервали от стойности, за които липсват пиксели, е възможно това да се дължи на артефакти. При всички случаи, ако

модата е при минималната или максималната стойност, това е индикация, че има загуба на информация в снимката.

Проекция, намаляване на измеренията и 3D нелинейни филтри. Човешкият ум и зрение изпитват затруднения при възприятието едновременно на многомерни изображения, комбиниращи пространствена, времева, многоканална и друга информация.

Основен подход за едновременно визуализиране на голямо количество информация от различни измерения е т.нар. проекция[85]. Тя се изразява в редуцирането на измеренията и наслагването на значимата информация в едно двумерно изображение (dimensionality reduction by projection). В случая, когато следва да се редуцира измерението за време, проекцията би представлявала изображение с траекториите на съдържащите се обекти.

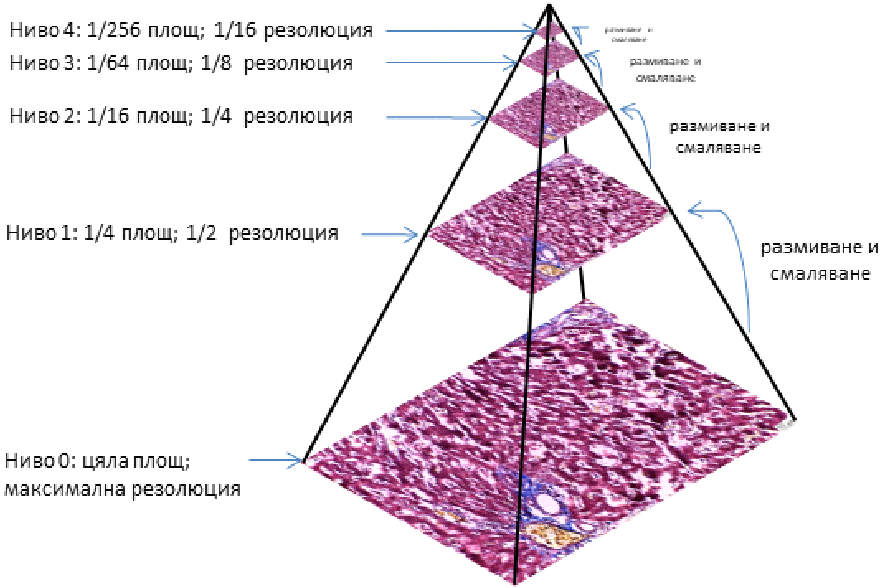
Един от подходите за генериране на траектории е т.нар. проекция на максималния интензитет (maximum intensity projection - MIP)[86]. При нея се сравняват интензитетите на всички пиксели с еднакви x и y координати, но различни времеви координати (t) и се избира за представяне само най-голямата стойност. Т.е. за всяка точка от изображението се прави сравнение със същата точка във всяко едно време на заснемане и в проекцията се отбелязва най-ярката измежду тях. Ако дори само в рамките на един кадър, ярък обект на тъмен фон се е намирал на тези координати, той ще бъде представен на тях. Това сравнение се повтаря за всяка една точка от двумерната повърхност. Така, ако яркият обект в отделни моменти се намира на различни x и y координати, то в проекцията ще бъдат едновременно наслажени всички местоположения за всички времеви точки. Ако имаме заснети 9 кадъра, тази операция ще представлява приложение на нелинеен 3D филтър с размери 1 × 1 × 9 (x × y × t). За да бъдат ясно представени траектории, които

се пресичат в определени моменти, скоростта на заснемане трябва да бъде съобразена със скоростта на обектите. Иначе, ако получените точки са твърде отдалечени, ще бъде трудно да се проследят и свържат в индивидуални траектории.

Ограничение на този метод на проектиране на траектории е, че се губи времева информация, понеже е трудно да се прецени посоката и скоростта на движение. Това може да бъде преодоляно, ако в процеса на проекция обектите се сегментират и се приложи известен градиент в контекста на цветна схема за постепенна промяна на цвета с времето. По този начин, в началото всички обекти/траектории ще имат един цвят, който през определени времеви интервали постепенно ще прелива в друг цвят.

Прилагайки различни нелинейни филтри в процеса на генериране на проекции, ще можем да извлечем допълнителни видове информация от същото видео изображение или time lapse. . Необходимо изискване е да е достатъчно представен фонът. Медианният филтър ще позволи да извлечем информация за фона, защото при интензивно движение на ярки обекти на тъмен фон, през по-голямата част от времето, повечето пиксели ще са незаети с обекти и съответно, с нисък интензитет. Полученият по този начин фон може да бъде изваден от изображението, при което обектите и траекториите им ще са ясно различими и артефакти от фона като светлосенки и неравномерно осветяване ще бъдат ограничени. Друг вид филтър, позволяващ корекция на неравен фон (*flat-field*[90]) на базата на няколко изображения, представени като пачка, е минимум 3D филтърът. Някои видове 3D филтри като филтърът за стандартно отклонение ще имат за резултат дробни числа, което налага резултатът да бъде съхранен в 32-битово изображение.

Пирамидни изображения. Представляват подход за представяне на една и съща информация в серийно намаляващи мащаби[84] (Фигура 7).



Фигура 7. Пирамидно представяне на големи изображения като поредици от изображения с прогресивно намаляващи размери и резолюция за целите на оптимизиране на изчислителните ресурси спрямо необходимата резолюция.

Постига се като обикновено бива намалявана резолюцията чрез постепенно размиване с Гаусов филтър, последвано от свиване на площта до получаване на все по малко ниво на детайли и размер на изображението (Фигура 7).

Пирамидите позволяват да се степенуват процесите и по ефективен начин да се анализират различни нива на детайли с оптимална инвестиция на изчислителен ресурс. Паралелната визуализацията на серия мозаечни изображения, всяко с размер

от няколко гигабайта, е значително улеснена, като се представят най-малките проекции от всяка пирамида.

Цветови характеристики

Цвят

Цифровите изображения могат да бъдат черно-бели (монохромни, представящи обектите в нюанси на сивия цвят) или цветни.

Цветът е вид възприятие, опосредствано от чувствителността на фоторецепторите в трихроматичната ни зрителна система за светлина с определени спектрални характеристики. Сами по себе си цветните цифрови изображения не съдържат спектрална информация. Цветът на екрана се възпроизвежда чрез разчитане на интензитетите на пикселите в отделните цветни канали спрямо правила, заложени в таблици за конвертиране на цветове (lookup tables, LUT). Те обозначават кое цветово представяне на кои комбинации от стойности на пикселите съответства.

В структурата на цветните изображения, липсва конкретна спектрална информация. Стойностите на пикселите в цветните канали зависи от чувствителността на сензорите във фотоматрицата към светлина в определени спектрални диапазони. По тази причина, добавянето на цвят към изображенията, следва да се възприема като интерпретация с известно ниво на субективизъм. При анализа на изображения е препоръчително да се запазят всички цифрови характеристики на изображението, и в същото време, отделни алгоритми да генерират цвят за целите на визуализацията.

Видове цветови модели

Цветовите модели описват числовото представяне и математическите взаимовръзки между цветовете[91]. Разработени са множество цветни модели за различни нужди, но тук ще представим само част от тях, които имат отношения към темата на труда.

Цветовите модели могат да бъдат адитивни или субтрактивни. При адитивните модели обикновено се добавя цветен интензитет към черен фон, като максимумът на всички интензитети е най-ярък и формира бял цвят. Най-популярният модел от този тип е RGB. При субтрактивните модели обикновено се добавя оцветяване към бял фон, като колкото по-плътно е оцветяването, толкова по-тъмен е цветът. Оцветяването на всички канали отнема от интензитета на белия цвят и се доближава към черния цвят. При тези модели има значение отразената светлина и се взема предвид светлината на източника, както и абсорбцията на отразяващата повърхност. Най-популярният субтрактивен модел е CYMK (Cyan – основно синьо, Magenta – пурпурно червен цвят, Yellow жълто, blacK – черно), който се прилага при принтиране.

RGB (Red, Green, Blue). Това е най-популярният цветови модел за представяне на информация на екран. При него всеки цвят се възприема като производен на цветовете червено (R), синьо (B) и зелено (G). Тази комбинация съответства на анатомичните особености на човешкото око, в което са разположени три вида рецептори за цвят, т.нар. колбички в ретината, като всеки от трите вида реагира на светлина с дължина на вълната, характерна за горепосочените три цвята. Възможните комбинации в този цветен модел могат да бъдат представени като заемащи ограничено кубично пространство, като един от ъглите на куба представлява началната точка в трите измерения или черният цвят, съседните три ъгъла – максимумите съответно

на чистите цветове червен, зелен и син, а противоположният ръб, максимумът едновременно на трите цвята, или белият цвят[92]. Често цветовете биват кодирани чрез шестцифрен формат по шестнайсетичната система (от 0 до F). Първите две цифри обозначават стойността на червения цвят, следващите две – на на зеления цвят и полседните две – на синия цвят, като преди шестте цифри се поставя символът „#“. Например, стойността #FF0000 ще представя червен цвят, понеже стойността на първите две цифри е максимална (FF в шестандесетичната система се равнява на 255 в двоичната система), а за зелен и син цвят – нули[93].

Недостатък на визуалното представяне чрез RGB модела е, че няма да бъде подходящ за далтонисти. За да се преодолее това, са разработени специфични цветни схеми (подбор на палитра от подходящи за определена цел цветове), наречени ColorBrewer[94]. Освен това чувствителността на човешкото око към синия цвят е по-слаба в сравнение с червения и зеления, затова не е удачно да се сравняват интензитети/яркости като мярка за концентрации представени със син и червен или зелен цвят. При сравнение на интензитети трябва да се разчита на числовите стойности, а не на визуалните наблюдения за изобразените цветове.

HSB (Hue, Saturation, Brightness). Този модел позволява по-интуитивно описание на цветовете. При него всеки цветен нюанс се представя чрез компонентите цвят (hue), наситеност/чистота на цвета (saturation) и яркост (brightness). Вместо като куб (подобно на RGB модела), цветовете в този модел формират цилиндър, в който изборът на цвят (H) от палитрата се определя от ъгъла (палитрата формира окръжност), чистотата на цвета (S) се определя от радиуса, или разстоянието от оста, а яркостта (B), от височината. Този модел разделя информацията за цвета от информацията за интензитета. Ако изображението бива преобразувано в монохромно, то информацията за

интензитетите в най-голяма степен ще се припокрива в информацията от канала за яркостта (B). В някои случаи, това е свързано с предимства по отношение на анализите на биоизображения. Директно могат да се сегментират обекти или само на базата на интензитета им, или само на базата на цвета, например оцветени с багрила клетки. Също така може да е възможно да се отстрани приноса на шума, ако има специфичен и различим цвят, без значение от вариабилния интензитет[95].

LAB (Luminance, A, B). Този модел представя цветовете по начин, който се доближава до възприятията на човешката зрителна система и не е дотолкова свързан с хардуерните особености на екрана, както RGB модела. При този модел компонентите за представяне на нюанси от цветове също са три и могат да бъдат представени като сфера, изградена около три перпендикулярни оси, пресичащи се в центъра ѝ. На едната ос е представен градиент от черен към бял цвят (Luminance), другата ос представя градиент от зелен към червен цвят (a), на последната ос – от син към жълт (b). Както и при HSB модела, информацията за спектъра (цвета) е разделена от тази за интензитета, но тук не един, а два канала представляват спектралната информация, за разлика от HSB, където тази цел изпълнява само "H" каналът. Подобно на HSB, разделянето на спектралната информация от интензитета има предимства по отношение на анализите на изображения. При някои специфични оцветявания (напр. Masson Trichrome[96]) представянето по този начин на цветното изображение може да позволи по-лесно отграничаване на съответните зони на интерес.

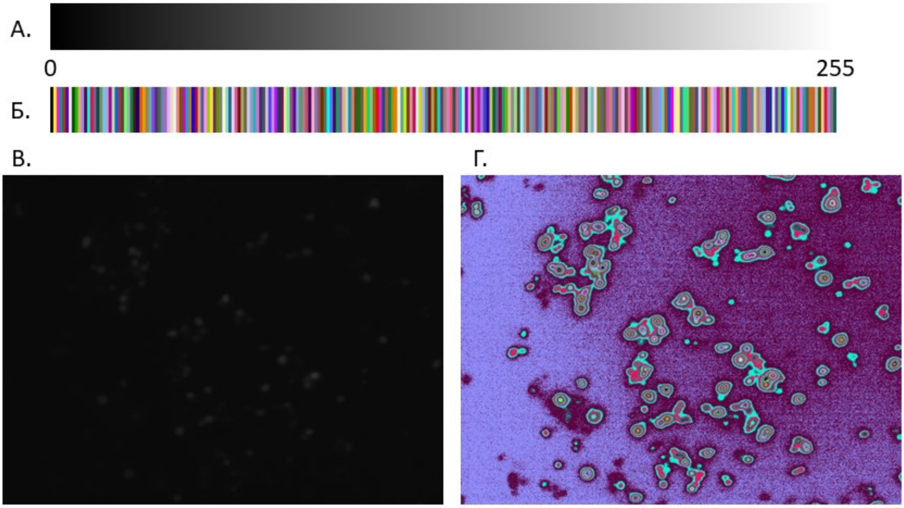
Таблици за конвертиране на цветове (LUT)

LUT представляват структури от данни, които свързват стойността на пиксел с конкретен цвят.

При монохромни изображения, състоящи се от само един канал, типичната LUT ще представлява градиент (като във Фигура 6 А.), указващ най-високата стойност да бъде представена като бяло, най-ниската (0), като черно, а пикселите по средата – като нюанси на сивото. Изборът на LUT ни дава голяма свобода по отношение на това как ще бъде визуализирано изображението на екрана или при печат.

При обръщане (инвертиране) на LUT, на екрана ще бъде показан своеобразен негатив на изображението. Без да се променя стойността на пиксела, най-високата стойност няма да бъде показана като бяла, а вече като черна, а най-ниската ще стане бяла. Това показва как при едно и също съдържание на изображението (без да бъдат променяни стойностите му), то може да бъде представяно на екрана по най-различен начин, според указаните в LUT правила. Всъщност, няма ограничение в едно едноканално монохромно изображение да укажем на LUT да представя само пикселите с определени интензитети, например между 0 и 20, с червен или какъвто и да било друг цвят.

Тогава изображението на екрана ще изглежда доста различно от това, погледнато през окуляра на микроскопа.



Фигура 8. Стандартна LUT с градиент на сивото (А.) и "Glasbey on dark"[97] LUT (Б.), налична в ImageJ/FIJI. Едноканална микрография със слаб fluorescenten сигнал (В и визуализация на същото изображение с помощта на "Glasbey on dark" LUT (Г.). Микрографията е заснета в ин витро лабораторията на Секция по Токсикология и представя модел на оксидативно увреждане на ендотелни клетки EA.hy926, третирани с DCFH-DA, флуоресциращ при наличие на вътреклетъчни реактивни форми на кислорода и азота.

По подобен начин, LUT могат да се прилагат за открояване на трудно забележими с просто око особености (Фигура 8). Дефинициите за цветовете в стандартните LUT предполагат плавно нарастваща яркост на цвета с увеличаване на стойността в пиксела (Фигура 8 А.) и е трудно да кажем точно в каква степен се различават интензитетите на група сиво-оцветени обекти. За постигане на ясно визуално открояване на зоните, в които интензитетът търпи малки изменения, могат да се прилагат нестандартни LUT като "Glasbey on dark" [97].

В други случаи, LUT могат да се прилагат с цел открояване на определени стойности, например максимума и минимума. По този начин, подчертавайки в различен цвят най-ярките и най-бледи пиксели, може да бъдат идентифицирани артефакти и свръхекспозиция в снимки, при които има трудно доловими разлики в интензитета.

При RGB изображения вместо един (както при монохромните), има три цветни канала, като обикновено LUT за тях е съвкупност от три LUT, представящи отсенките на трите основни цвята. При смесването на тези три интензитета, биват генерирани всички познати цветове и комбинациите могат да бъдат изобразени като куб. Чрез промени в LUT за RGB изображения могат да бъдат симулирани различни видове осветление.

При композитни изображения също има повече от един канал. Такъв е случаят, когато снимаме поотделно флуоресценция на ядра, микротубули, актин и митохондрии. В тези случаи всеки слой носи информация за различна клетъчна структура. За прегледност, слоевете могат да бъдат комбинирани в едно многоцветно изображение, като за целта първо на всеки слой се прилага различна LUT, за да е лесно визуалното им разграничаване и евентуално наблюденията на колокализация.

Корекции в изображенията или само в начина на представяне

При анализа на изображения трябва да се прави разлика между начина на представяне на данните и самите данни. Яркостта е мярка за визуалното представяне на средния интензитет на изображението, а контрастът е мярка за визуалната разлика в интензитетите между пикселите с най-ниски и най-високи интензитети. Подобно на LUT, промяна в яркостта и контраста променя начина на представяне на данните (кои стойности на пикселите как да бъдат представени на монитора), но не и

самите данни или стойността на всеки един пиксел. Това е залегнало като принцип и в ImageJ/FIJI.

Въпреки това, има начин промените във визуализацията да бъдат нанесени в изображението за постоянно, при което необратимо ще се промени и информацията, намираща се в него. Препоръчително е подобни постоянни промени да се правят само върху копие на изображението, което ще бъде използвано за визуализация и презентиране, но не и за анализи на изображения.

При сравнение на интензитети, яркостта и контраста оказват значително влияние върху възприятията ни. За да се избегне неправилно тълкуване на серии от експериментални изображения, промените в яркостта и контраста следва да бъдат идентични за всички изображения и условията за осъществяването им да бъдат ясно упоменати. Освен това, манипулациите в изолирани зони от изображението обикновено са неприемливи.

Деконволюция на цветове

В цветни изображения на ярко поле, като тези на хистологични срезове, при повечето протоколи за оцветяване резултатът съдържа няколко вида цветово-маркирани компоненти. Разделянето им в отделни канали би могло да бъде от полза при интерпретацията на изображението или за някои последващи анализи като сегментация и колокализация[98]. Ако различните цветове са чисти нюанси на червения, зеления и синия цвят и перфектно отговарят на RGB каналите на изображението, разделянето би било тривиално. В реалната ситуация, цветовете, които трябва да разделим съдържат комбинации с различен принос едновременно на червения, зеления и синия цвят. Чрез деконволюция на цветовете или спектрална деконволюция, на

базата на примери с референтни цветове (вектори) могат да бъдат разграничени каналите за до три цвята[99].

Този подход е силно зависим от използваните вектори и от белия баланс. В случаи, когато камерата не е калибрирана по отношение на цветовете, алгоритъмът за деконволюция на цвят не дава добър резултат. Необходимо е да имаме неутрален (бял или сив) фон, което е индикация, че R, G и B имат еднакъв принос. В противен случай, фонът видимо ще има цветен нюанс и следва да се приложи операция на изваждане на стойността на фона с корекция за цвета.

Резултатите са по-добри, когато определим векторите за деконволюция с нашите проби и апаратура за заснемане, понеже понякога експерименталните условия (вид тъкан, температура, време за инкубация) могат да доведат до разлики с дадените по подразбиране цветни вектори в наличните софтуерни продукти като ImageJ/FIJI. Софтуерът QuPath[100] предлага функции и допълнителни инструменти, подпомагащи идентифицирането на векторите за деконволюция. Директното приложение на резултата от деконволюцията за измерване на интензитет не е препоръчително, защото вариацията между условията за пробоподготовка и заснемане се отразява на възпроизводимостта и смисъла на получения резултат.

Метаданни

Цифровите изображения трябва да бъдат възприемани и третирани като контейнери на данни. Метаданните са данни за данните или нещо като етикет или досие. Те съдържат информация за вида изображение (брой пиксели, дълбочина, мащаб µm/пиксел), използваната апаратура и евентуално, условията на заснемане и др. Метаданните са ключови за правилното интерпретиране на изображенията и обикновено са

записани като компонент, съдържащ се в същия файл като изображението[101].

Файлови формати

Файлът, съхраняващ битовете, изграждащи всеки пиксел от изображението обикновено има и заглавна част (header елемент), която указва какви са структурата и характеристиките му и как да бъдат правилно разчетени въпросните битове. В тази част на файла се съдържат и метаданните. Различните файлови формати се различават по отношение на възможностите им по отношение на постижимата резолюция, дълбочина, вид цветова информация, възможност за прилагане на компресия и съхранение на метаданни. Неправилният избор на файлов формат гарантира загубата на един или друг вид информация. По тази причина оригиналните изображения се съхраняват в непроменен вид, докато анализите се осъществяват върху техни копия.

При които се губи информация

JPEG е файл, позволяващ добра компресия (до около 100-кратно), който съхранява визуално-възприеманите елементи, но пък при всяко записване се преобразуват стойностите на отделните пиксели и така се губи информация. Поддържа 8 или 12 бита дълбочина и RGB, но не и алфа канал. Този формат е подходящ само за презентиране, но не и за анализ на изображения.

JPEG2000 е формат, разработен от същата група като JPEG, но значително се различава. Алгоритмите за компресия са различни, при което се постига още по-добра компресия, като има възможност да бъде загубена или съхранена информацията в пикселите. Този файлов формат, според начина на употреба

може да бъде използван и без да се губи информация при компресия. Позволява по-голяма дълбочина и добавяне на различни данни, включително за очертания на региони на интерес (ROI), но обработката му е бавна и в крайна сметка е непопулярен.

При които не се губи информация

TIFF обикновено не включва компресия, но дава възможност за съхранение на 8, 16 и 32 битова информация до 5 измерения. Заема сравнително голямо място в паметта, но пък липсата на компресия означава, че ще бъде прочитан бързо, тъй като няма да е необходимо да се декомпресира и реконструира. Съдържа метаданни, но е възможно, ако се трансформира от софтуер, който не е за анализ на експериментални изображения, те да бъдат преформатирани.

OME-TIFF е специално пригоден за анализ на микрографии и успешно разрешава проблема с възможното преформатиране на метаданните в TIFF, но е съвместим предимно със специализиран софтуер.

BMP позволява малка компресия без загуба на информация, но размерът на файловете е голям.

PNG позволява добра компресия без загуба на информация, но поддържа само 8 бита дълбочина и поради необходимостта от декомпресия, ще е по-бавен за разчитане.

HDF5 е формат, специализиран в съхранението на многомерни изображения за научни цели. Недостатък е, че може да бъде отворен предимно със специализиран софтуер.

JPEG2000 позволява както компресия със загуба на информация, така и без.

Специални формати

Едно от предимствата на ImageJ е, че съществуват пакети, които позволяват да се отварят повечето видове формати изображения, включително такива, разработени за работа със специфични търговски платформи. Такава е инициативата Bio-Formats, която поддържа инструмент, съвместим с ImageJ/FIJI, QuPath и други софтуерни колекции, за които ще стане въпрос по-късно. Той позволява да бъдат разпознати, разчетени и конвертирани над 150 формата за съхранение и обработка на цифрови изображения[101,102].

Размери на файловете и изчислителна мощ

При възможностите за автоматично заснемане на голям брой снимки с висока резолюция, в рамките на само един експеримент могат да бъдат генерирани огромни по обем данни. Това добавя допълнително ниво на комплексност по отношение на хардуерния ресурс и времето, свързано с тяхното записване, съхранение и обработване. Това трябва да бъде взето предвид още при планирането на дизайна на експеримента. Нужно е да се намери баланс между вида, количеството и качеството на информацията, която планираме да получим чрез заснетите изображения и наличния хардуерен и времеви ресурс. Освен това, за тежки операции може да се обследва дали прилагането на паралелни изчисления с помощта на GPU няма значително да ускори процеса[103].

Ако се интересуваме само от скоростта на промяна в броя на клетките, достатъчно е да заснемем ядрата с ниска разделителна способност за няколко времеви интервала, но ако научният въпрос е свързан с отчитане на мутации в ядрата, то ще е необходимо да се генерират изображения с по-висока разделителна способност, като вероятно няма да загубим важна

информация, ако увеличим времевия интервал и по този начин намалим броя снимки.

Изборът на разделителна способност ще зависи основно от размерите на структурите, които трябва да наблюдаваме за да отговорим на научния си въпрос, а интервалите на заснемане – от скоростта на биологичните процеси, които ни интересуват. Начин за намаляване на размера на изображенията е чрез процеса на обединяване на пиксели (binning) на детектора на камерата при заснемане, при който броя пиксели се намалява с определен фактор. Най-често площ от детектора, отговаряща за четири пиксела се обединяват и функционират като един, събирайки повече фотони, при което и шумът намалява.

Други особености, свързани със скоростта на заснемане, като експозицията, са определящи за съотношението сигнал към шум. Може да се наложи компромис с качеството за сметка на по-голям брой заснети изображения за единица време.

Друг важен фактор е стресът, който се причинява на експерименталната система при заснемане. Например, при получаването на флуоресцентни изображения може да се увредят клетките, което да доведе до изменения в експерименталната система и невъзможност да бъде получен адекватен резултат[104].

Видове операции, прилагани при анализа на изображения

За да бъде осъществен успешен анализ на изображения трябва да бъдат съобразени процесите от генерирането на подходящи изображения, предварителната им обработка (preprocessing), същинския анализ, извличането на информация в подходящ

формат, интерпретацията на получената информация и формулирането на изводи за релевантните характеристики на обектите в изображението. В този раздел са разгледани алгоритми, имащи отношение към предварителната обработка и същинските анализи.

Точкови операции

Точковите операции представляват прости аритметични изчисления, които се прилагат върху стойностите на всеки един пиксел в изображението без заобикалящите го пиксели да оказват влияние. Целта на точковите операции е да се получат производни изображения с подобрени визуални характеристики (яркост, контраст, лесно забележими обекти със сходни интензитети) или да бъдат откроени малки разлики в стойностите на пикселите в подобни изображения. Аргументи (входящи стойности, необходими за изчислението) на точковите операции могат да бъдат единично изображение, единично изображение и константа, две изображения с еднакви размери или отделни канали в многомерно изображение. В резултат, стойността на пикселите се променя в следствие на операции като събиране, изваждане, умножение, деление, коренуване, логаритмуване и др. Предимство на точковите операции е, че ако са ясно описани, можем да приложим противоположната операция (като изваждане при предходно събиране) и да възстановим началните стойности. Ако обаче резултатът бива запазен в 8-битово, а не в 32-битово изображение, при получаване на резултат, по-висок от максималната стойност (255 при 8-бита), той ще бъде закръглен до съответната максимална стойност и първоначалната информация в него необратимо ще се изгуби (изрязване, *clipping*). Приложението на точкови операции е допустимо за научни цели, стига това да е достатъчно добре аргументирано и стъпките да са ясно описани.

Върху всички пиксели на едно изображение

Когато точковите математически операции засягат всички пиксели в изображението, те се наричат глобални. В повечето случаи, тези операции са удобно средство за целите на визуализацията. Въпреки това, ако е възможно, е препоръчително вместо тях да се прилагат LUT, защото не променят подлежащите стойности на пикселите. Друга алтернатива е точковите операции да се извършват върху копия на изображението, предназначени само за визуализация.

Нормализация на серии от изображения

Прилага се за целите на визуализацията, за да бъде уеднаквена яркостта в поредица от изображения, в които тя силно варира поради нестабилен светлинен източник. Това е адекватен подход, когато ни интересуват само очертанията и броят на обектите, но не и интензитетите им. Яркостта измежду всички изображения може да бъде уеднаквена (нормализирана) според желана средна стойност по следната формула:

$$I_{\text{нов}} = \frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \times \mu_{\text{нова}}$$

където I е интензитетът на конкретния пиксел, I_{max} и I_{min} са най-ниската и най-високата стойност, отчетени измежду пиксели в същото изображение, $\mu_{нова}$ е желаната нова средна стойност, която искаме да зададем за всички изображения и $I_{нов}$ е резултатът, или новата стойност на конкретния пиксел.

Свиване на интензитета

Човешкото око възприема информацията в контекст и в някои ситуации, трудно може да разграничи нюансите. При изображения с голяма дълбочина и динамичен обхват, е трудно едновременно да се възприемат бледи пиксели в контекста на

много ярки такива. За да направим подобно изображение визуално по-възприемчиво, може да приложим нелинейна операция като логаритмуваме или коренуваме всички пиксели. Така, ще намалее приносът на най-ярките пиксели и ще се увеличи относителният принос на най-бледите, което ще ги направи по-забележими. Тази оптимизация на визуалното представяне би могла да се осъществи чрез LUT с логаритмувани или коренувани стойности, но при повечето налични софтуерни колекции това не е достатъчно бързо, лесно и удобно.

Между две изображения

При този вид точкови операции, стойностите на отделните пиксели от едното изображение се прилагат към стойностите на пикселите със същите координати в другото. Този вид операции имат по-голямо значение за анализа на изображения и се използват много по-често от точковите операции с едно изображение. Те са важна част от предварителната обработка на изображенията, понеже позволяват да ги приведем във вид, подходящ за последващи анализи, и след това да приложим резултата от въпросните анализи върху началното изображение.

Откриване на разлики между две изображения

Две копия на изображение може визуално да изглеждат еднакви, но едното от тях да е било преобразувано, например, чрез компресия. За да идентифицираме промените, можем да извадим едното изображение от другото или да намерим частното им. Резултатът ще покаже нагледно кои части на изображението са най-променени вследствие на трансформацията. По същия начин може да се определи и зависимостта между два различни канала на едно изображение и разликите да бъдат ясно откроени с подходяща LUT.

Корекция на неравен фон (*normalised flat-field*)

При светлинна микроскопия на ярко поле може да се наблюдават постоянни неравности в осветеността на различни региони от изобаженията, които систематично се възпроизвеждат като неравномерен фон в снимките. В този случай, могат да бъдат правени по две снимки – на слайда без и с обект на заснемане и след това, частното на двете изображения ще даде като резултат изображение с хомогенен, равен фон. Ако неравността се дължи на постоянните характеристики на апаратурата, чрез осредняване на множество изображения, може да се създаде калибрационно изображение, което пресъздава неравния фон и може да бъде прилагано за нормализирането му[105]. Чрез този подход, ако например, в центъра си снимката е по-силно осветена, може да се направи така, че осветеността по краищата да е същата. Ако резолюцията в краищата също е влошена обаче тя няма да се повлияе. При голяма вариация между яркостта на центъра и краищата, може оптималното решение да бъде да се изрежат краищата от снимките (crop) преди да се извършват други анализи с тях.

Операции между слоеве в многомерни изображения (пачки)

Може едно изображение да бъде приложено с определена формула/операция на всички канали или пък върху всеки n-ти канал на едно изображение да бъде приложена операция с всеки m-ти канал на друго многоканално изображение, но при условие, че броят изображения и размерите им в двете серии, m и n, са с еднакъв брой.

Прилагане на маски

Маските представляват бинарни изображения, които обикновено са резултат от сегментация на оригиналното изображение. Процесът на сегментация е разяснен по-долу в

труда. При този тип изображения зоните на интерес, заемани от определен вид обекти, обикновено са представени като бели силуети на черен фон[106]. След като умножим изображенията на маската и оригиналното изображение, пикселите, принадлежащи на обекта, биват умножени по едно и остават непроменени, докато фонът се умножава по нула и се заменя с хомогенен черен цвят. Това позволява, последващите анализи да бъдат фокусирани изцяло върху обектите от интерес, като се има предвид фракцията от изображението, заемана от площта им.

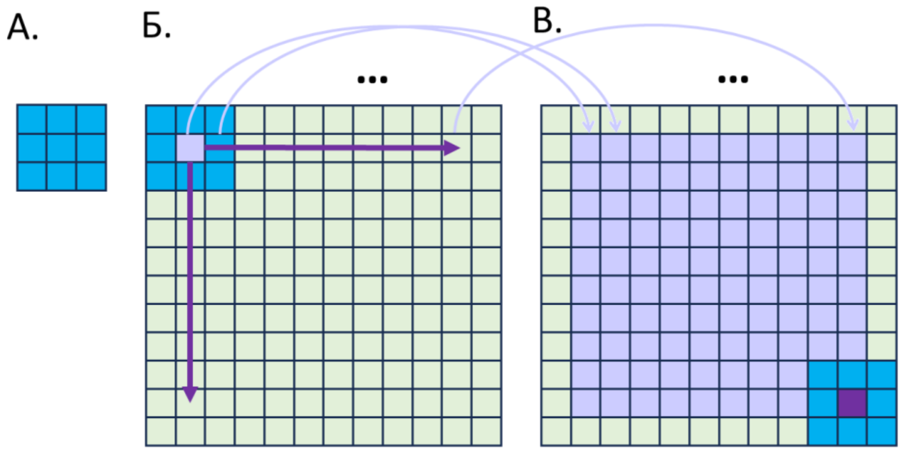
Пространствени филтри

При всички изображения има източници на изкривяване и шум, които не позволяват директно да бъде извлечена значимата информация. Точковите операции не са достатъчно гъвкави, за да се справят с този проблем, защото разглеждат пикселите само като отделни единици, а не в контекста на обкръжението им.

В този случай е по-подходящо приложението на пространствени филтри. Целта на приложението на филтри е да се увеличи визуалното въздействие на елементите, които ни интересуват и едновременно с това, да се намали въздействието на елементите, които не ни интересуват. Действието на филтрите се определя от вида и размерите на ядрата им (наричани и маска на филтъра), които сами по себе си представляват числови матрици, изградени от стойности - филтърни коефициенти. Ядрата обикновено са квадратни с нечетен брой редове и колони (при четен брой, резултатът се измества леко, понеже има повече от една централна стойност). Ядрото се налага последователно върху всяка възможна зона на изображението и се осъществяват математически операции, включващи не само пиксела, който бива преизчисляван, но и обкръжаващите го пиксели, „покрити“ от ядрото (Фигура 9). Изчисленията се

осъществяват спрямо определени правила и според вида правило, филтрите биват две големи групи, линейни и нелинейни.

Тъй като за приложението на филтрите е необходимо изчисление не само на базата на стойността на централния пиксел, но и на заобикалящите стойности, няма как да бъде приложено еднакво правило за пикселите по периферията,



Фигура 9. Приложение на пространствени филтри. Ядро на филтъра в син цвят (А.), оригинално изображение в зелен цвят (Б.) и получено след приложение на филтъра изображение (В.) Стойностите, получени вследствие на операциите с филтъра са отбелязани със светло виолетов цвят, като последната изчислена стойност при придвижването на филтъра е в пиксела, обозначен с тъмно виолетово. Адаптирано по Coste (2012).

понеже те не са оградени от всички страни с други пиксели, върху които да се разположи ядрото на филтъра. За да не се промени размерът на полученото след филтриране изображение, периферните пиксели могат да бъдат оставени непроменени, да

бъдат заменени с черен цвят (0), да бъдат запълнени със стойностите на най-близките резултатни пиксели или да бъдат приложени други подходи.

За решението на проблемите с шума, можем да приложим линейни филтри, които осъществяват т.нар. конволюция или преплитане и размиване на внезапните флуктуации. Може да се направи паралел между ядрото на някои линейни филтри и функциите за разсейване на точка при оптични системи, понеже и двете определят по какъв начин ще бъдат разширени и размити очертанията на обектите в изображението.

Чрез филтри са възможни и други мощни трансформации, непостижими чрез точкови операции, като ограничаване или елиминиране на шум, артефакти, елиминиране на фон и открояване на елементи на обекта от интерес. Може да бъде променена и остротата на детайлите в изображението в посока открояване на определени детайли, или обратно. Освен в измеренията x и y, филтрите могат да действат и върху комбинации от пиксели, включващи срезове, съответстващи на измеренията z (пространство) и t (време). Големината на ядрото и стойностите на филтърните коефициенти определят вида на филтъра и резултата.

Въпреки предимствата си пред точковите операции, приложението на филтри обикновено е необратимо, защото не води до хомогенна промяна във всеки един пиксел. Все пак, когато е необходимо да бъдат променени стойностите на всички пиксели без оглед на взаимното им разположение, се прилагат бързите и обратими точкови операции. Приложението на филтри трябва коректно да бъде описано в при приложението им в научни публикации[108]. По-долу са представени някои от най-често използваните филтри:

Линейни филтри

При линейните филтри, ядрото осъществява линейна комбинация между подлежащите пиксели. Първо, всеки елемент на матрицата се умножава с подлежащия пиксел, след това получените стойности се сумират, и накрая резултатът може да бъде нормализиран, обикновено като се раздели на броя на елементите на ядрото. В резултатното, филтрирано изображение, получената стойност заема координатите на пиксела в първоначалото изображение, върху който е разположен центърът на ядрото. След това, матрицата се измества със стъпка един пиксел, докато не се генерира филтрирано изображение със същите размери като първоначалното. Начинът на функциониране на линейните филтри е достъпно представен като онлайн видеоилюстрация от Pete Bankhead[16].

Филтър за среден интензитет

Това е най-простият линеен филтър за конволюция. Ядрото му представлява матрица, в която всички коефициенти имат стойност 1 (Фигура 10). В резултат изображението придобива замъглен вид. С увеличаване на размерите на ядрото, замъгляването става по-изразено. Недостатък на този филтър е, че контурите на обекти, по-малки от размера на матрицата, се размиват значително.

1	1	1
1	1	1
1	1	1

Фигура 10: Ядро на филтър за среден интензитет

Гаусов филтър

При този вид филтър централният пиксел на ядрото има висока стойност (Фигура 11) и води до по-изразена конволюция или размиване в сравнение с филтъра за среден интензитет.

$$\begin{matrix} 1 & 2 & 1 \\ 2 & 4 & 2 \\ 1 & 2 & 1 \end{matrix}$$

Фигура 11: Ядро на Гаусов филтър

Филтър за откриване на очертания (*edge finder*)

Те са несиметрични и включват и отрицателни стойности, като действието им ще бъде най-изразено в определена посока. Начинът на функциониране на този вид филтри зависи от това дали оста им на симетрия е хоризонтална или вертикална и къде спрямо тази ос са разположени положителните и отрицателни стойности. Там, където се срещат зони с нисък и висок интензитет, този филтър ще води до стойности с високи интензитети, които се открояват.

$$\begin{matrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{matrix} \quad \text{или} \quad \begin{matrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{matrix}$$

Фигура 12: Ядра на филтри за откриване на очертания

Комбинирането на Гаусов филтър и филтър за очертания е успешна стратегия за откриване на очертанията на обекти в изображенията.

Филтър за изостряне (*sharpen*)

Освен за конволюция или размиване, филтрите могат да дадат резултат с видимо противоположни ефекти или изостряне на

разликите в интензитета в определени зони на изображението. Точно такава е функцията на филтъра за изостряне. При него централната стойност е много изразена, а периферните елементи са с отрицателни стойности

$$\begin{matrix} -1 & -1 & -1 \\ -1 & 9 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{matrix}$$

Фигура 13: Ядро на филтър за изостряне

Нелинейни филтри

При нелинейните филтри, се прилагат нелинейни операции върху стойностите на централния пиксел и обкръжението му, за да се достигне до съответния резултат за всяка позиция на филтрирания образ. Морфологическите оператори също са подклас на нелинейните филтри.

Медианен филтър

Той е най-често прилаганият нелинеен филтър. В сравнение с Гаусовия или филтъра за среден интензитет, медианният в по-малка степен размива очертанията на обекта, дори с увеличаване на диаметъра, но пък все така ефективно се справя с шума.

Филтри за минимум и максимум

При тъмен фон, филтърът за минимум позволява да се акцентира върху фона, а ако диаметърът на ядрото е по-голям от даден светъл обект, резултатът ще бъде със стойността на фона и очертанията на обекта ще бъдат видимо изтънени и избледнели. При светъл фон, ще е обратното, ще бъдат подчертавани тъмните елементи. Същото е валидно за филтъра за максимум, само че в обратна посока. Тези филтри имат отношение към морфологическите операции.

Сложни нелинейни филтри

При други видове филтри като *Kuwahara*[109] и анизотропния му вариант[110,111], стойностите следва да бъдат параметризирани спрямо характеристиките на изображението и желания резултат. Kuwahara съхранява очертанията и едновременно с това елиминира шума, докато анизотропният му вариант позволява формирането на стилизирани абстракции на изображението.

Фурие (Fourier) преобразуване

При наличие в изображенията на различни повтарящи се мотиви, подчиняващи се на очевидна или не симетрия, чрез употребата на мощни инструменти, мотивите могат да бъдат математически описани по възпроизводим начин. Чрез Фурие преобразуване, цифровите изображения могат да бъдат преобразувани под формата на поредица от синусови вълни с определена честота (разстояние между пиковете) и амплитуда. Някои от най-често използваните технологии в ежедневието ни нямаше да бъдат приложими на практика без помощта на подобни трансформации. Информация със сравнително сложна форма като тази, формираща цифрови изображения и звукозаписи може да бъде представена като комбинации от множество синусови вълни с различни честоти и амплитуди, при което процесът е обратим и първоначалното изображение/звукозапис може да се възстанови. Когато е преобразувано във Фурие пространството, изображението се представя чрез променливите амплитуда и честота и има формата на фигура със строга радиална симетрия, изградена от точки с различен интензитет, групирани около централен бял пиксел. Всяка точка има близначна точка, точно противоположно на централния, бял пиксел. Точките, близо до пиксела, представят компоненти на изображението с малка честота и проявяващи се на относително отдалечени пиксели, например

плавна промяна в осветеността на фона. Най-отдалечените от центъра точки пък, обратно – описват компонентите в изображението с голяма честота, например малки детайли и шум. Ако прокараме линия между две точки във Фурие-преобразуваното изображение, описващи определен мотив на нормално-представеното изображение (например артефакт от наклонени надясно ивици), то във Фурие пространството, линията между двете водещи точки (групи от точки), описващи същия мотив, ще бъде ориентирана перпендикулярно (90°) на линиите в нормалното изображение, т.е. ще бъде с ляв наклон. Подобни мотиви, повтарящи се системно в цялото изображение могат да бъдат изолирани във Фурие-преобразуваното изображение, след което да бъдат използвани върху други изображения като филтър за премахване на подобни дифузно-проявени артефакти, покриващи големи части от изображението. Важно е да се отбележи, че Фурие преобразуваното изображение може да се обработва чрез селектиране на пикселите с определени интензитети (отграничаване) или пък според радиалната им отдалеченост от централния пиксел, след което изображението да се преобразува обратно в нормалната си, визуално разбираема, интерпретация. По този начин може да се ориентираме приблизително кои зони от Фурие-преобразуваното изображение на кои мотиви в изображението съответстват.

Фурие филтри

Получените по този начин Фурие-преобразувани филтри, представят мотиви на изображението, върху които можем да акцентираме или да ги премахнем. Чрез субтракция (изваждане) във Фурие пространството и последваща обратно Фурие преобразуване до стандартно изображение, може да получим изображение, лишено от определени системни артефакти. Филтрите могат да представляват зони от Фурие-

преобразуваното изображение, избрани спрямо отдалечеността от центъра. Такива са *lowpass* филтърът, при който избираме само точките, намиращи се в определен периметър от центъра (обикновено за мотиви с малка честота и дифузно проявление) и *high pass* филтърът, при който, обратно, се избират само точки от периферията, извън очертанията на сфера с определена отдалеченост от филтъра (за мотиви с по-голяма честота и проявление, забележимо при близко-разположени пиксели). Т.нар. *bandpass* филтър комбинира *lowpass* и *highpass* филтрите и във Фурие пространството наподобява пояс от стойности, които искаме да бъдат оставени в изображението. Чрез него могат да се изолират мотиви с мащаби в определени от нас рамки (горна и долна граница на размерите). Когато в микроскопските изображения се наблюдават дълги ивици с различно осветяване, те могат да бъдат успешно идентифицирани във Фурие пространството и елиминирани. Друг случай, когато Фурие филтрирането е полезно, е когато имаме по-изразено осветяване на изображението в центъра, в сравнение с краищата.

Сегментация

Една от най-трудните задачи при анализа на изображения е идентифицирането на обекти и класифицирането им. Типичната задача пред сегментацията е да бъдат различени обекти от фон. До този момент, човешката зрителна система е еталон в това отношение, тъй като е перфектно адаптирана да анализира обекти в контекста на заобикалящата ги среда. Въпреки това, определени мотиви се забелязват трудно от човешкото око. Приложението на комплексни алгоритми за сегментация на изображения в някои случаи и при определени условия, могат по-бързо от експерт да разграничат някои видове туморни от здрави клетки в хистологичен срез.

Основна задача пред сегментацията е да определи кои пиксели от изображението принадлежат към определен клас обекти. Това се осъществява за всеки пиксел от подаденото изображение, при което резултатът е категоризирането му в един от няколко интересуващи ни или открояващи се класа. С други думи, от изображение с определена дълбочина и дискретни стойности за интензитет/цветни канали, ще получим изображение, в което пикселите могат да заемат само няколко стойности (колкото е броят на интересуващите ни класове от снимката). Така полученото, обработено изображение най-често е бинарно (с два класа), защото към всеки пиксел се прилага определено условие, характерно за интересуващия ни клас, като резултатът може само да е 1 – да (пикселът отговаря на условието) или 0 – не (пикселът не отговаря на условието). Така полученото бинарно изображение се нарича „маска“ и може да бъде записано в различни формати. В ImageJ бинарните изображения се представят като 8-битови (256 стойности), в които обаче пикселите не заемат други стойности, освен най-ниската – 0 (не, черен цвят) или най-високата – 255 (да, бял цвят). При наличие на повече от два класа, някои от пикселите ще заемат трета стойност, която ще е еднаква за целия клас и ще е различна от 0 и 255. Знаейки стойността, която пикселите от всеки клас заемат, лесно ще може да ги изолираме с проста операция като отграничаване.

Цел на сегментацията на пиксели

Получените бинарни изображения позволяват върху тях да се приложат допълнителни операции за идентифицирането на контурите, групиращи пикселите в отделни обекти, на които обикновено се дават индекси и подлежат на допълнителни операции като преброяване и охарактеризиране.

Техники за сегментация на пиксели

Разработени са множество техники за сегментация на пиксели, вариращи от най-базовите методи като отграничаване на пиксели в рамките на определени гранични стойности до сложни методи като машинно обучение. Тук е обърнато внимание само на най-често прилаганите методи.

Отграничаване (*thresholding*)

При този клас методи решението дали определен пиксел спада или не към даден клас се взема единствено въз оснoва на това какъв е интензитета му на базата на определени минимални/максимални граници. Така, пикселът ще заеме стойност 1 и ще бъде класифициран като сигнал, ако стойността, която заема попада в зададените граници, а в останалите случаи стойността му ще е 0 и ще бъде класифициран като фон. Обикновено тези методи се прилагат върху монохромни изображения и са прости и бързи.

Тези методи имат много ограничения. Дори при заснемането на един и същ обект с една и съща камера, при еднакви условия, ще се наблюдават разлики в минималната, максималната стойност и модата. Това може да се дължи на редица променливи, които може да не са под наш контрол, като например нестабилното осветление от лампата. Ако приложим едни и същи гранични стойности на серия изображения, представящи един и същ обект, заснето повторно няколко пъти, то поради горепосочените вариации, всеки път получената маска ще бъде различна. Важно при извършването на анализ на изображения е да се прилагат еднакви условия при всички изображения и да се елиминира субективният елемент.

Задаването на границите може да бъде както емпирично от оператор (проба-грешка), така и автоматизирано, след анализ на

формата и границите на хистограмата, която се справя с елемента на субективност, но само донякъде. Автоматизираното задаване на граници може да бъде осъществено чрез редица математически методи, като изборът на един пред друг, също е емпирично. Предимството на автоматичното задаване на граници е, че при сравняване на повече изображения, в известен смисъл то ще компенсира някои разлики в експозицията/осветяването. Въпреки това, дори и в рамките на едно изображение обикновено има артефакти, неравномерно осветяване и шум, които ще затруднят поставянето на граници, които да са правилни за пикселите във всяка една област от изображението. Опит за коригиране на подобно неравномерно осветяване е разделянето на изображението на по-малки изображения и прилагането на локално отграничаване (*auto local treshold*). Някои от тези методи ще подчертават прекомерно пиксели с ниски стойности, други – пиксели с високи стойности, а останалите – междинни стойности. Въпреки това, при всички методи на отграничаване, няма как да се избегне добавянето на шума към маската, ако стойностите на пикселите, дължащи се на шум са над минималната граница. Това е постижимо само чрез комбинирането на отграничаването с преди това приложени филтри за конволюция.

Друг недостатък на тези методи е, че при прекалено голямо или малко експониране (избелване или твърде слабо-осветяване) на изображението, част от хистограмата ще бъде отрязана и няма да може да бъде адекватно анализирана, при което резултатът от автоматизираните методи ще бъде изкривен. Друг проблем пред автоматичното отграничаване е, че при изображения с хистограми с различна форма, например при *ин витро* 2D снимки с различна конфлуентност, отново алгоритъмът ще доведе до изкривяване и несъпоставимост на маските за сравнение. Основният критерий при избора на метод е той да дава възможно най-възпроизводим видим резултат върху

съвкупността от всички снимки, които ще бъдат анализирани и сравнявани.

Клъстеризация

При методите за клъстеризация, пикселите се групират спрямо подобията и разликите помежду им по отношение на всички променливи, които ги описват. Клъстеризацията е частен случай на ненадзиравано (unsupervised) машинно обучение. Широко приложение в анализа на изображения намира клъстеризацията по метода на К-средните величини. При нея е необходимо предварително да знаем в колко класа трябва да бъдат разпределени пикселите в изображението. Т.е. в едно изображение може да присъстват всички класове, а ако в друго липсва патология, броят класове да е по-малък. При този метод, броят клъстери, който сме задали (показателя К) първоначално се формират като предварителни клъстери около случайно разположени центроиди. След това, се изчисляват нови центроиди на базата на тези първоначални клъстери. Поетапно, циклично на базата на междинните центроиди, всеки пиксел се преразпределя към най-близкия от съществуващите К центроида. Тази циклична операция продължава, докато не се достигне до определен критерий, указващ че клъстеризацията е приключила. За разлика от отграничаването, при клъстеризацията по метода на К-средните величини могат да се използват и RGB изображения и да се категоризират повече от два класа. Въпреки това, случайното задаване на първоначалните центроиди може да деформира резултата. Прилагат се и други методи за клъстеризация като очакване – максимизация.

Метод на нарастващите региони

Този метод изисква първоначално задаване на ядра, от които да стартира. Алгоритъмът анализира подобието между съседните

пиксели. Ако те са достатъчно подобни на растящия регион на ядрото, той ще продължи да се разширява. В противен случай, регионът спира да нараства. Когато определен критерий (конвергентност) е изпълнен или всички пиксели са били анализирани, се получава резултатната маска. Обикновено този алгоритъм в началото се движи бързо, но постепенно растежът на регионите утежнява изчисленията и отнема повече време до достигане до резултат. Основни недостатъци на този метод са бавната скорост и необходимостта да се зададат първоначални ядра.

Дълбоко обучение

Към момента дълбокото обучение е най-успешният съществуващ метод за сегментация на сложни изображения [112]. Принципът му е представен по-подробно в следващата глава. При надзираваното (supervised) обучение е необходимо предварително да се зададат примери, чрез обозначаване на зони, отговарящи на определен клас, след което алгоритъмът се обучава да класифицира изображенията. На практика, с увеличаването на броя анотации, алгоритъма се забавя. Повечето големи софтуерни колекции позволяват приложение на дълбоко обучение. Резултатите от тези алгоритми могат да се представят като сегментирани бинарни маски. Веднъж обучен, класификаторът може да бъде приложен върху голям брой непознати изображения, но ако те са заснети при условия, твърде различни от тези на снимките, на базата на които е обучен класификатора, може резултатът да бъде незадоволителен. Слабост на този метод е, че резултатът е силно зависим от качеството на анотация при обучението на класификатора.

Морфологически операции

След като сме се справили със задачата да разграничим обектите на интерес от фона, е необходимо да приложим върху тях

допълнителни операции, за да съответстват на структурите, за които искаме да извлечем информация. Морфологически операции, които, както подсказва името, са свързани с трансформации във формата, размерите и контурите на получените групи от сегментирани пиксели и могат да доведат до междинни резултати като очертания на обектите, сливане или разграничаване на очертанията на близки обекти, откриване на гранични структури и създаване на нови подобекти. Желаният краен резултат от морфологическите операции често е получаване на точни очертания за всеки интересуващ ни обект в изображението. Обикновено морфологическите операции се прилагат върху бинарни изображения (маска, резултат от сегментация на оригиналното изображение), като резултатът от тях също е бинарно изображение. Морфологическите оператори са подклас на нелинейните филтри и резултатът отново зависи от размера и формата на филтърното ядро.

Прости морфологически оператори

Дилатация (*dilate filter*)

При тази операция, маските на обектите в сегментираното, бинарно изображение се уголемяват. Ядрото на този филтър функционира на базата на следното правило: ако централният пиксел е различен от 0, тогава всички пиксели, обхванати от ядрото, ще приемат стойност 1. Ако централният пиксел е 0, то не настъпва промяна в околните. Пикселите, които вече са били анализирани от периферията на филтъра и стойността им е била оставена непроменена на 0, също биват променени на 1, тъй като отново попадат в периферията на филтъра, но този път в контекста на централна единица. По този начин, около групата пиксели със стойност 1, се добавят в съседство един или повече редове (според размерите на ядрото) пиксели също със стойност 1. Така, контурите се разширяват. Проста вариация на този

филтър е с квадратно ядро, състоящо се само от единици и със страна 3 пиксела. Въпреки това, има и по-сложни филтри, изградени от 0 и 1 с различна симетрия. Общото между тях е, че ако централният пиксел има стойност нула, подлежащите околни пиксели не се променят, а се променят само ако централният пиксел съдържа 1.

Ерозия (*erode*)

Принципът на този филтър е противоположен на филтъра за дилатация, макар че операциите на се съвсем обратими. При него размерите на обектите намаляват, т.е. те се свиват. Ако всички пиксели съвпадат с ядрото, не се прилага промяна. В противен случай, централният пиксел се променя на 0. Приложението първо на единия от двата филтъра (*erode* или *dilate*) и после на другия води до резултат, различаващ се от първоначалното изображение. Тези разлики могат да бъдат полезни за операциите затваряне и отваряне, представени по-долу.

Затваряне (*closing*)

При комбиниране първо на дилатация и след това на ерозия, близки обекти се обединяват в един общ обект. Тази операция се нарича затваряне. Резултатът се дължи на първоначално сливане, поради разширяване на обектите, което обаче при повторно свиване до първоначалните размери на границите, не води до прекъсване на получените „мостове“. За разлика от прилагането само на дилатация, при затварянето, размерите на обектите остават същите, с изключение на новопоявилите се, свързващи ги „мостове“.

Отваряне (*open*)

Обратната последователност от операции, се нарича отваряне. Първо се прилага ерозия, след това, дилатация. При отварянето, ако контурите на отделни обекти първоначално се допират на снимките, те биват разделени в резултата, и контурите им са напълно разделени.

Сложни морфологически алгоритми

Според характеристиките на изображението и взаимното разположение на заснетите обекти, обикновено трябва да се комбинират различни морфологически оператори, за да се отделят допиращи се или припокриващи се обекти в отделни маски със собствени контури. В някои случаи, единствено watershed ще е достатъчен за това, в други – ефективността на процеса ще е подобрена като преди това се приложи запълване на дупки, а в трети, при предварително осъществено затваряне. Тези операции са много ефективно за създаване на хомогенна бинарната маска и на очертания. Получените очертания могат да бъдат приложени за зониране на суровото изображение, при което да се приложат допълнителни анализи на отделните обекти, например за интензитет на флуоресценция, свързана с определен протеин или малка молекула.

Алгоритми, прилагани върху бинарни изображения

Вододелен (*watershed*)

Този алгоритъм се прилага за разграничаване на допиращи се обекти. Действа чрез първоначална ерозия до отделни точки, след което – до дилатация на всяка точка, която спира за съответната точка или когато очертанията достигнат първоначалното очертание на обекта или до очертанията на

съседен обект. Той е ефективен когато обектите не се застъпват твърде много и когато са хомогенни (без дупки). Резултатите не са добри, когато алгоритъмът се прилага върху нехомогенни обекти.

Запълване на дупки

Този алгоритъм е много често използван. Той създава хомогенни обекти чрез запълване на дупките в тях. Ограничението му е, че ще запълни и пространства, получени между съседни застъпващи се обекти. Алгоритъмът е изграден от следните стъпки: първо се идентифицира кои пиксели представляват фон в бинарното изображение. След това, се идентифицират „дупките“, като групи от пиксели, заобиколени от всички страни с обекти, които не са фон и накрая стойността на пикселите във въпросните идентифицирани „дупки“, се променят да съвпадат със стойността на пикселите, с които са обозначавани обектите, по този начин „запълвайки дупките“ [113].

Скелетонизация (*skeletonization*)

Понякога е полезно обектите в едно изображение да бъдат редуцирани до техния скелет. Така, сферичните структури ще бъдат представени като точки, овалните - като линии, бъбрековидните - като извити линии, а тези които са със сложна форма – като разклонени линии и т.н. Когато трябва да бъдат анализирани характеристиките на нишковидни биологични структури, този тип анализи намират голямо приложение.

Вороной (*Voronoi*)

Противоположно на скелетонизацията, при която се обектите се свеждат до минималистично представяне, при *Voronoi* алгоритъма (*dirichlet teselation*) е обратното – обектите се увеличават, докато не достигнат до очертанията на други обекти

и в крайна сметка, не заемат цялата площ на изображението. Както и при watershed, първоначално свиваме обектите до точки, след което те се подлагат на операция, представяща механизъм за нарастване на регионите, което обаче не спира с достигане на първоначалните контури на обекта, а до достигане на очертанията на друг растящ регион или до крайните пиксели по ръба на изображението.

Карти на дистанцията (*distance maps*)

При тях, интензитета на всеки пиксел в изображението се представя като разстояние до най-близкото препятствие, като под препятствие се разбира контур или ръбовете на изображението. Дистанцията може да бъде изчислена според различни методи, като най-разпространеният е на базата на Евклидовото разстояние, респективно резултатът е карта на Евклидовите разстояния. Това представяне има голямо практическо значение, защото помага при изчисленията, свързани с операциите скелетонизация, крайни точки и Voronoi.

Алгоритми, прилагани върху монохромни изображения

Анализ на обекти

Анализът на обекти позволява след като е генерирана бинарната им маска, да бъдат идентифицирани поотделно в оригиналното изображение. Могат да бъдат приложени и критерии като форма и размери, които да позволят да изберем само обектите, които ни интересуват пряко и да филтрираме други, сходни обекти, които не ни интересуват. Често прилагана операция е извличането на информация за координатите и очертанията на обектите като отделна информационна структура, която може да бъде запазена в същия или отделен от изображението файл. След като се идентифицират всички очертания на обектите, представляващи интерес за конкретния анализ, можем да

правим индивидуални измервания в тези очертания, като ги налагаме на различните канали на оригиналното изображение, описващи същите обекти. По този начин може да бъде измерен интензитетът само на отграничените зони, съдържащи съответния маркиран протеин. Ако зрителното поле обхваща клетки, част от които са положителни, а друга част – отрицателни откъм даден флуоресцентен маркер, то снимката с флуоресцентна микрография с този маркер няма да позволи да се идентифицират контурите на всички снимки. При това, резултатът ще показва погрешно завишена фракция на позитивните за съответния маркер, клетки. За да имаме измерване, отчитащо всички клетки, необходимо е регионите на интерес да бъдат формирани на базата на маска, формирана от друг канал на същото изображение, евентуално базиран на флуоресцентна микрография, обхващаща друг флуорофор, който маркира всички клетки без изключение. Винаги е необходимо да има такъв референтен канал, независим от ефекта, който ще измерваме.

Извличане на числови измерители

Крайната цел на гореописаните операции е да бъдат представени характеристиките на изображенията по обективен начин, чрез числови или логически измерители. Логическите измерители дават отговор „да“ (1) или „не“ (0) и могат да бъдат резултат от стъпка на сегментация или комбинация от операции с контури. Логическите измерители биват количествено охарактеризирани (фракция положителни клетки) и превърнати в числови такива.

Тези измерители могат да бъдат приложени към брой клетки, фракция от клетки с определени характеристики, форма, ориентация и разпределение по координати.

Автоматизация и високопроизводителни анализи

Гореописаните операции и алгоритми позволяват от суровото изображение да бъде извлечена много информация за обектите, които ни интересуват. Този процес обикновено е свързан с изграждане на многостъпални работни потоци. Ако всяка стъпка бъде ръчно изпълнена чрез работа с мишка, интерфейс, прозорци и менюта, обработката на папка с десетки и стотици изображения, би била свързана с изразходване на време и усилия, а поради умора – и до грешки, изискващи допълнително време и усилие да бъдат коригирани.

Софтуерните колекции, които позволяват управление чрез команден интерфейс, дават възможност за автоматизирането на работните потоци. Така, при ImageJ е възможно изпълнението на последователности от операции и алгоритми върху цели партиди от изображения или т.нар. партидно (*batch*) приложение. Важно условие, за да е възможна автоматизацията на процеса, е подаваните изображения да са заснети при достатъчно възпроизводими условия, така че резултатът от прилаганите операции да е достатъчно добър. В противен случай, трябва да се пишат сложни условни алгоритми, които да валидират адаптации на подхода спрямо параметрите на получаваните междинни резултати. Една от най-уязвимите на малки вариации в изображенията стъпки е тази на сегментацията и предхождащото я приложение на филтри с определени параметри. Веднъж след като изображенията биват приведени в бинарни маски, вариабилността бива значително ограничена.

За успешното приложението на автоматизация е нужен известен качествен контрол чрез визуализиране на ключови процеси с оглед при несъвместимости, те да могат да бъдат установени. В противен случай, може да не е очевидно, ако числовият резултат е грешен, особено при огромен брой изображения.

Друго предимство на автоматизирането на процеса е, че работният поток може да бъде споделен и независимо възпроизведен.

Има подходи за подпомагане на оператор, който не се чувства достатъчно уверен в писането на програмен код. В ImageJ, кодът, описващ командите, може лесно да бъде генериран чрез прилагането на ръка, с мишка и менюта, на отделните команди от работния поток в активиран режим „записване на макро алгоритъм“ („*record macro*“). След това, автоматично генерираната последователност от команди под формата на код, може да бъде копирана, леко адаптирана и поставена в прозореца за партиден анализ на цели папки. Резултатът за множество изображения накрая бива изведен под формата на подходящи таблици от стойности или обработени изображения. Въпреки удобствата на т.нар. партидно приложение, то има ограничения, които могат да бъдат преодолени чрез директното приложение на macro скриптове.

Ако е необходимо интегрирането на последователност от операции, включващи стъпки, изпълними с помощта на няколко софтуерни продукта, може да се приложи запазването на междинен резултат в новосъздадена папка, която след това да бъде обработена от следващия софтуер или пък да бъде приложен софтуер, който интегрира работата на поредица от софтуери в един автоматизиран протокол (*pipeline/workflow*). Такъв софтуер е KNIME. Той е особено подходящ за изследователи, които предпочитат да избегнат работата с програмен код. KNIME позволява визуалното подреждане на операции в модулен формат. Чрез него могат да бъдат интегрирани скриптове за ImageJ, Ilasatik, Cell Profiler и др., включително сложни методи за анализ на данни в R и Python.

Под високопроизводително тестване (*high throughput screening, HTS*) обикновено се има предвид роботизиране на процесите на

боравене с експерименталния модел и заснемане през определено време на голям обем информация. Предимствата на тези подходи са в способността за генериране на огромни обеми информация с добра възпроизводимост. Недостатък е високата цена на апаратурата. Тяхното приложение е силно зависимо от софтуерната автоматизация.

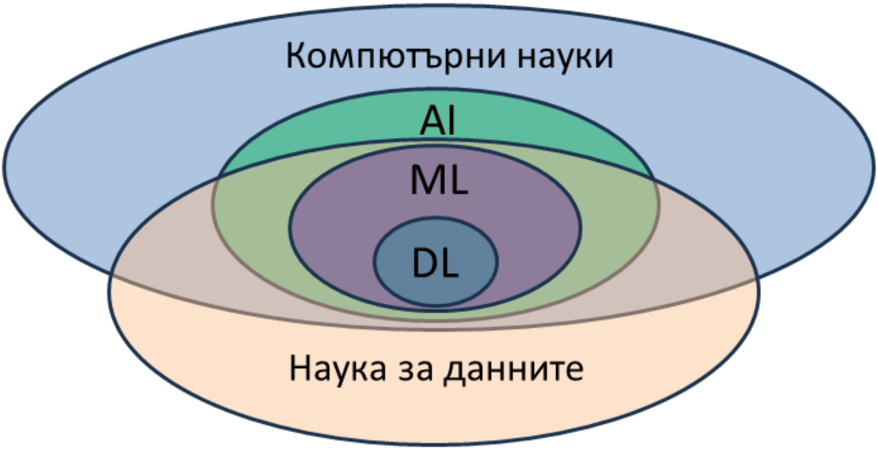
Изкуствен интелект (AI) и анализ на биоизображения

AI представлява научна област, която е подразделение на компютърните науки (информационните технологии). Занимава се със създаването на компютърни модели и програми, които могат да изпълняват логически задачи, които обикновено изискват автономност и адаптивност, присъщи за човешката интелигентност. Съществуването на AI се основава на схващането, че „всеки аспект на обучението или всяка друга характеристика на интелекта, може принципно да бъде толкова детайлно описана, че да се направи машина, която да я симулира“, формулирано от McCarthy et al. през 1955 г. [114]. Към момента, липсва единна дефиниция не само за понятието „изкуствен интелект“, но и за по-общото понятие „интелект“ („интелигентност“). И в двата случая значението е променливо според контекста [115]. Точната дефиниция е затруднена и по други причини. Понятието AI се прилага фриволно за обозначаване на технологични инструменти и процеси с най-различно приложение и комплексност, а смисълът му допълнително се размива при обичайните асоциации, целенасочени или не, с жанра „научна фантастика“ [116]. За да се внесе яснота, е полезно разграничението на “общ” (general, AGI) AI, “тесен” (narrow, ANI) AI, “слаб” AI и “силен” AI [117]. Под AGI се разбира способността за справяне с всякаква интелектуална задача, ANI може да се справя само с конкретни, строго-дефинирани задачи, например сегментиране на пиксели и области в изображения или

управление на автономни автомобили. Под “силен” AI, се разбира такъв, който има самосъзнание и истински осмисля действията си, докато под „слаб“ AI се разбира такъв, който чрез прилагане на логична последователност от правила, имитира осъзнаване на задачата. Всички приложения на AI към момента могат да бъдат категоризирани по-скоро като „тесен“ и „слаб“ AI [117]. Счита се, че техники като машинно обучение и неговото подразделение, дълбоко обучение, са основополагащи за постигане на интелигентни компютърни приложения.

Машинно (само)обучение (ML)

Представлява подразделение на изкуствения интелект (също на науката за данните), което се занимава с разработката на алгоритми и модели, които позволяват на компютрите да се "обучават" от постъпилите данни и с натрупания опит, да подобряват представянето си по отношение на генерираните прогнози и решения, без да се налага да бъдат конкретно програмирани за буквалните стъпки за разрешаване на поставения проблем[118]. Машинното обучение използва статистически методи и алгоритми, за да анализира и извлича знание от данни[119]. Комплексността на прилаганите алгоритми за машинно обучение варира от прости такива, като наивния Бейсов класификатор, до комплексните невронни мрежи, използвани за дълбоко обучение. Взаимовръзките между изкуствения интелект, машинно, дълбоко обучение и науката за данните, са представени във Фигура 14.



Фигура 14. Взаимовръзки между Компютърни науки, Наука за данните, Изкуствен интелект (AI), Машинно обучение (ML) и дълбоко обучение (DL), представени под формата на диаграма на Ойлер. Адаптирано по MinnaLearn and University of Helsinki (2018)[18]

Машинното обучение с „учител“ (надзиравано)

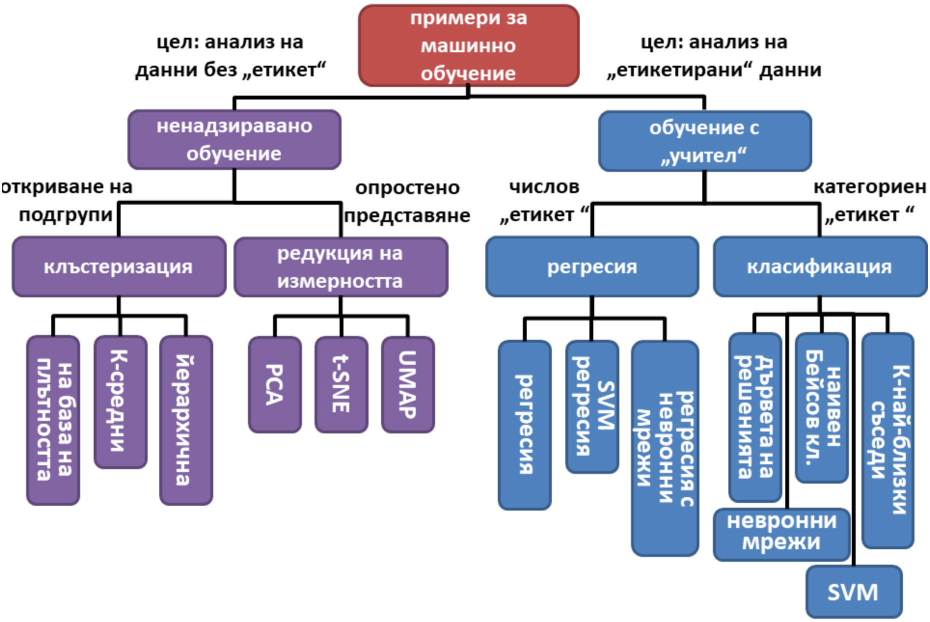
Вместо да се напишат конкретни последователности от правила за разпознаване на характеристиките на заснетия обект, в класификатора се предоставя комплект предварително охарактеризирани, класифицирани и етикетирани примери за обучение (training set). След това, вече обучената система, при предоставяне на нови, непознати изображения (или друг вид данни), би трябвало да ги класифицира към един или друг клас, стига този клас да е бил представен на системата при обучението. Например, ако предоставим на обучения модел снимка на клетка и той трябва да я класифицира като здрава, некротизирала или апоптотична, то в процеса на обучението би следвало да са предоставени достатъчно примери за такива

клетки. Ако на същия класификатор се представи клетка, претърпяла други морфологични промени, тя няма да бъде адекватно класифицирана.

<u>Машинно обучение без учител (ненадзиравано)</u>

При тази разновидност на системата не се задават примерни класове и съответно, обработката на данни не произвежда класифициран и етикетиран резултат. В този случай, резултатът е групиране на изображенията или различните области в дадено изображение на базата на подобие, спрямо идентифицираните от системата „скрити“ характеристики. При това може да бъде постигнато формирането на необозначени групи или клъстери, спрямо степента на подобие. При данни с множество описани характеристики, се прилага т.нар. намаляване на измерността. Характеристиките биват опростени и групирани след идентифициране на най-важните мотиви, отличаващи отделните изображения или области от едно изображение. Това значително улеснява графичното представяне и осмислянето на разпределението на различните проби спрямо най-отличаващите ги характеристики, като обаче тези характеристики не са директно описани, а подлежат на изясняване. Въпреки че получените при ненадзиравано обучение групи не се обозначават като правилно или грешно класифицирани, впоследствие, при разглеждане на известни сходства и разлики между тези групи, те могат да бъдат етикетирани от експерт. Например, ако предоставим на системата голямо количество снимки на клетки с различна морфология, без тя да е била предварително тренирана с каквито и да е предоставени от нас примери, в резултат, снимките ще бъдат групирани спрямо мотивите, отговорни за подобието помежду им. След анализ на експерт в контекста на

налична за тях информация, например метаболомен профил,



Фигура 15. Примери на типични методи за машинно обучение. Съкращения: PCA – анализ на главните компоненти, t-SNE – t-разпределено вмъкване на стохастични съседи, UMAP – равномерна многократна апроксимация и проекция, SVM – машина с поддържащи вектори. Фигурата не е изчерпателна по отношение на видовете методи за машинно обучение. Адаптирана по [121]

може да се окаже, че визуалният мотив, който ги отличава, е трудно разпознаваем от човешката зрителна система. Впоследствие, след внимателна преценка и анализ, въпросният признак, може да се окаже подходящ кандидат за визуален диагностичен маркер по отношение на биохимични изменения в клетката. От примерите на Фигура 15 се вижда само малка част от разнообразието от методи за надзиравано и ненадзиравано машинно обучение. Показани са някои от най-типичните методи,

като според нуждите на конкретния анализ някои ще са по-добри от други. Изборът на метод на машинно обучение зависи от специфичната задача, като Greener et al. (2022)[120] предлагат достъпен подход за избор. Измежду методите за машинно обучение, се открояват невронните мрежи, които са в основата

на дълбокото обучение и са способни да се справят с някои от най-предизвикателните задачи пред анализа на изображения, като сегментацията им. Друга форма на ненадзираваното обучение е т.нар. **генеративно моделиране**, при което обученият класификатор, например разпознаващ апоптотични клетки, може да генерира нови изображения на клетки със същите характеристики. Този подход набира популярност през последните няколко години под формата на техника, наречена генеративни състезателни мрежи (generative adversarial networks, GAN). Те са базирани на невронни мрежи (вж. по-долу).

При GAN параметрите на обучените неврони се използват за генериране на изображения, при което могат да бъдат изолирани параметрите от различните слоеве на мрежата и да се определи как всеки слой от мрежата „вижда“ класифицирания обект. За да се получат обаче реалистични изображения, GAN са изградени на принципа на комбиниране на две невронни мрежи, които се „съревновават“ да се обучават една друга, или циклично резултатът от едната подсилва обучението на другата и обратно. Целта на едната мрежа е да генерира реалистични изображения, докато целта на другата мрежа е да разпознава дали генерираните изображения са достатъчно реалистични. Така, първата система ще се обучава да генерира все по-реалистични изображения, а втората, да разпознава все по-добре нереалистичните изображения.

Усъвършенстването на GAN поставя под съмнение максимата „ще повярвам, когато видя с очите си“.

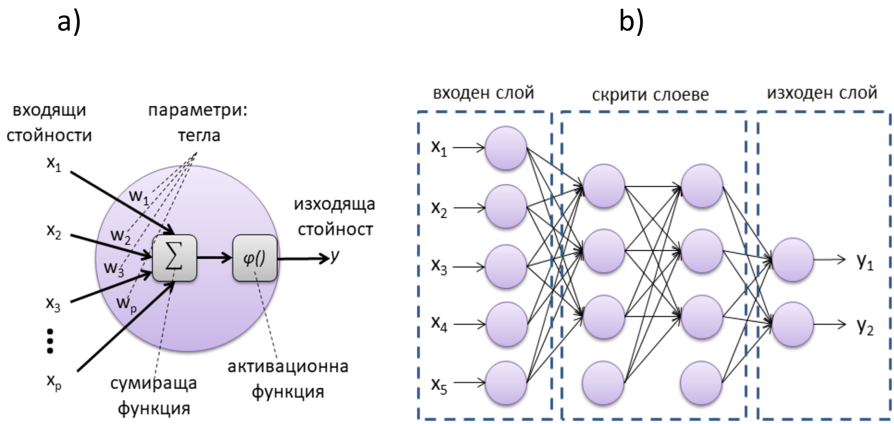
Машинно обучение с утвърждение (reinforcement learning)

Прилага се, когато системата получава с известно забавяне информация дали определено нейно решение е било правилно или грешно, при което тя трупа „опит“ и подобрява представянето си в съответната среда. Например, при подаване на множество снимки на клетки, системата може да ги групира в класове, като при всяка следваща обработена снимка, опитен изследовател подава информация дали тя е класифицирана правилно или грешно. При това, представянето постоянно се усъвършенства при правилно подадени оценки.

Границите между различните видове машинно обучение понякога са размити и определен метод може да бъде труден за класифициране. При всички случаи, с увеличаване на опита на системата или постъпилата нова информация, тя подобрява ефективността на представянето си.

Дълбоко обучение (DL)

Най-успешната и популярна поддисциплина на машинното обучение по отношение на анализа на изображения е DL, при което се прилагат комплексни математически модели, наречени изкуствени невронни мрежи, структурирани в множество слоеве (оттам и името "дълбоко"). Основната логическа единица в тези мрежи, „невронът“, е базирана на теоретичния модел на неврон, хипотетизиран през 1943 г. от Уорън Маккълък и Уолтър Питс и реализиран като машината персептрон през 1957 г. от Франк Розенблат.



Фигура 16. Схематично представяне на единичен неврон (а) и на права невронна мрежа, изградена от входен слой, два скрити слоя и изходен слой. Адаптации по [122] *и* [29].

Постъпилата числова информация в неврона бива преобразувана чрез прилагане върху нея на т.нар. активационна функция, която определя критериите за преобразуване на резултата от изчисленията в неврона в информация, която дава отговор на класификационния въпрос или в случая на многопластови мрежи, да се предаде на следващото ниво неврони за допълнителна обработка. Отделният неврон може да бъде функционално оприличен на филтър, който извлича определена информация, подобно на разгледаните по-горе линейни и нелинейни филтри[123,124]. Практическата приложимост на дълбоките (многослойни) невронни мрежи става възможно чрез изобретяването на алгоритъма за обратно разпространение на грешката (backpropagation), възприет в практиката в края на 1980-те, но актуален и до днес. При процеса на обучение, след като веднъж входящите анотирани данни бъдат обработени от активационните функции на невроните, преминавайки през всички слоеве, включително последното изчисление на резултата на изхода, на базата на отчетената грешка между реалния и прогнозния резултат, този алгоритъм се прилага в

обратна последователност (от изход към вход на данните), при което биват коригирани параметрите на невроните, така че да се намали грешката и да се подобри точността на представянето на класификатора.

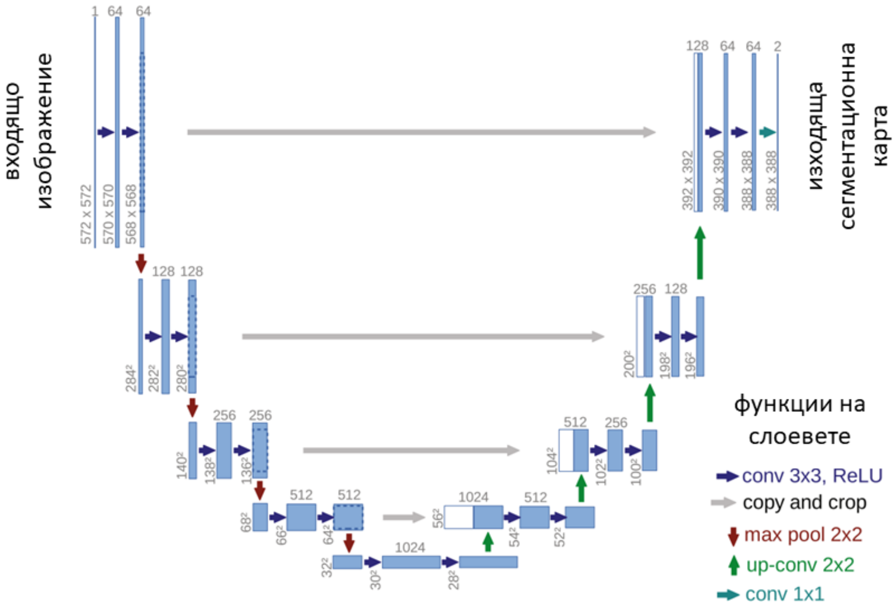
Затруднение пред разпознаването на форми от невронните мрежи е това, че ако приемем например, че целта на неврона е да идентифицира хоризонтална линия, то невронът ще се прилага активационна функция, вземаща предвид примерно пикселите по продължение на линия, прекарана между средните точки на лявата и дясната граница на изображението. При леко завъртане по посока на часовниковата стрелка, обаче, по-голямата част от линията вече ще се разминава с областта, за която невронът ще е „бдителен“. Това може да се компенсира чрез приложението на алгоритъма за обратно разпространение на грешката, което би изисквало добавянето на в пъти повече допълнителни слоеве и драстично увеличаване на нужните изчислителни ресурси. По-добър начин, по който този проблем бива разрешен, без разхищение на изчислителен ресурс, е добавянето на т.нар. „конволюционен“ слой, при което се формира т. нар. конволюционна невронна мрежа (CNN). Тази разновидност на невронните мрежи има способността да отчита контури и форми, тъмни петна, яркост, цвят, без да е толкова чувствителна към ориентацията, мащаба и разположението на съответния обект спрямо полето на снимката. Конволюционните слоеве обикновено се разполагат в близост до входящите данни и тъй като те са отговорни за разпознаването на общи по смисъл мотиви като ъгли и очертания, които присъстват във всякакви видове изображения, могат да се използват успешно върху огромни обеми разнородни снимки, с всякакъв вид мотиви. По този начин, въпросните мотиви биват идентифицирани в обобщен вид, а следващите слоеве прецизират класификацията.

При процеса на обучение на невронните мрежи, се осъществява промяна на конфигурацията/съвкупността от конкретните

параметри (тегла, коефициенти), присъщи на всеки отделен неврон в мрежата. Моделът се адаптира спрямо подаваните примерни снимки, но самите снимки не се съдържат или запаментяват в него. Архитектурата със заучени параметри бива конфигурирана така, че да функционира като общ логически цифров отпечатък на правилата, които позволяват прогнозиране спрямо характеристиките на обучителния материал. Заучените правила могат да бъдат генерализирани, т.е. да позволят класификацията и на непознати снимки, неприсъстващи в обучителния комплект с примери. Все пак, ако моделът е обучаван върху примери на хепатоцити и фибробласти, няма как да се очаква, че ще идентифицира правилно неутрофил.

При употребата на вече обучения модел върху тест-изображения, невроните на входа получават информация за всеки пиксел на изображението и поетапно, преминавайки през различни слоеве, я обработват и препредават помежду си, като на изхода на невронната мрежа бива класифицирано цялото изображение или сегменти от него (сегментация) спрямо класовете, с които е обучен.

Подредбата на невроните в различни видове слоеве и архитектури с определени форми позволява оптимизиране на функционалностите и ефективността на моделите за конкретни видове приложения. Най-подходящият тип архитектура варира според вида изображение, но сред най-популярните и успешни са т.нар U-Net (поради U-образната подредба на слоевете, представена на Фигура 17) за 2D биоизображения и V-Net[125] за 3D биоизображения.



Фигура 17. Схематично представяне на невронна мрежа от типа U-net. Вляво са входните слоеве, а вдясно – изходните. Адаптация по Ronneberger et al. (2015)[126].

DL е сред AI инструментите, които са най-подходящи за справяне с проблемите, характерни за анализа на изображения.

Приложението на невронни мрежи е свързано и с някои хардуерни особености. Въпреки че CNN са разработени през 1980 г. от Kunihiko Fukushima[127], тяхното приложение набира

популярност едва след 2000 г., именно поради усъвършенстването и достъпността на хардуера на масовите компютри. Традиционно, централният процесор (CPU) на компютъра е отговорен за обработка на порции информация, които се достъпват последователно, една по една от компютърната (RAM) памет, която е отделен компонент и след обработката им от процесора, се записват обратно пак там. При невронните мрежи обаче, е по-подходящо паралелното изчисляване на функциите, присъщи на всеки един от множеството неврони в мрежата, за което по-пригоден е графичният процесор (GPU)[128]. Друго предимство на GPU пред CPU е, че при GPU е възможно съвместяването на съхранението и обработката на информацията на едно място. Така, чрез паралелното изчисляване на операциите, съответстващи на всеки неврон, изчислителното време за обучение и употреба на дълбоки невронни мрежи се свежда до приемливи граници.

При липса на наличен компютър с достатъчно бърз GPU, може да се използват безплатни, базирани в „облака“ услуги, предоставящи възможността да се използват техните GPU за разработка и приложение на паралелни изчисления. Такива са Amazon SageMaker[129], Google Colab[130], Kaggle[131] и др. Благодарение на тях, приложението на дълбоки невронни мрежи вече е изключително достъпно.

Освен това, дълбокото обучение намира приложение и в задачи като разпознаване на обекти, разпознаване на реч, машинен превод и други[132].

Първоначално, когато DL набира популярност като метод за анализ на изображения, мненията сред изследователите на биоизображения са противоречиви и поляризирани. Някои приемат DL възторжено, а други веднага го отхвърлят категорично като неадекватен подход, поради т.нар. ефект на

"черната кутия", или ограничената възможност да бъде обяснен начина на функциониране на получените модели.

За да адресират съображенията на скептиците и да създадат предпоставки за минимизиране на присъщите рискове и преодоляване на пречките пред максималното оползотворяване на потенциала на DL при анализа на биоизображения, Uhlman et al (2022)[133] разработват списък с добри практики за внедряване и приложение на модели за DL за анализи на биоизображения.

Обясними модели (XAI, explainable artificial intelligence)

Тъй като всички съществуващи приложения на AI до момента спадат към т.нар. „слаб“ AI, те не са способни да обяснят решенията и действията си. Понастоящем се полагат усилия за разработване на т.нар. обясними модели, които се очаква да бъдат част от „третата вълна AI системи“. Тези модели следва да са способни да дадат обяснение за начина си на функциониране и на базата на това, потребителите да имат достатъчно разбиране, така че да ги управляват успешно [134]. В биомедицинската сфера, подходите за обяснение могат да бъдат приложени преди, по време и след приложението на модела, като най-често прилаганият подход за обяснение е визуалният [135]. Например, моделът показва важните зони от изображението, които е идентифицирал, и на базата на които взема решения, или пък чрез т.нар. пертурбационно-базирани обяснения изменя входящите изображения по такъв начин, че демонстрира какви промени биха довели до вземане на алтернативно решение. Друг подход е текстовото обяснение, свързано с текстово описание на изображенията и, евентуално, представяне на примери за обясняваните концепции. Трети подход е пример-базираното обяснение, при което при определен етап на обработката се предоставят примери, свързани със съответното решение, което се взема на момента. Така операторът може да

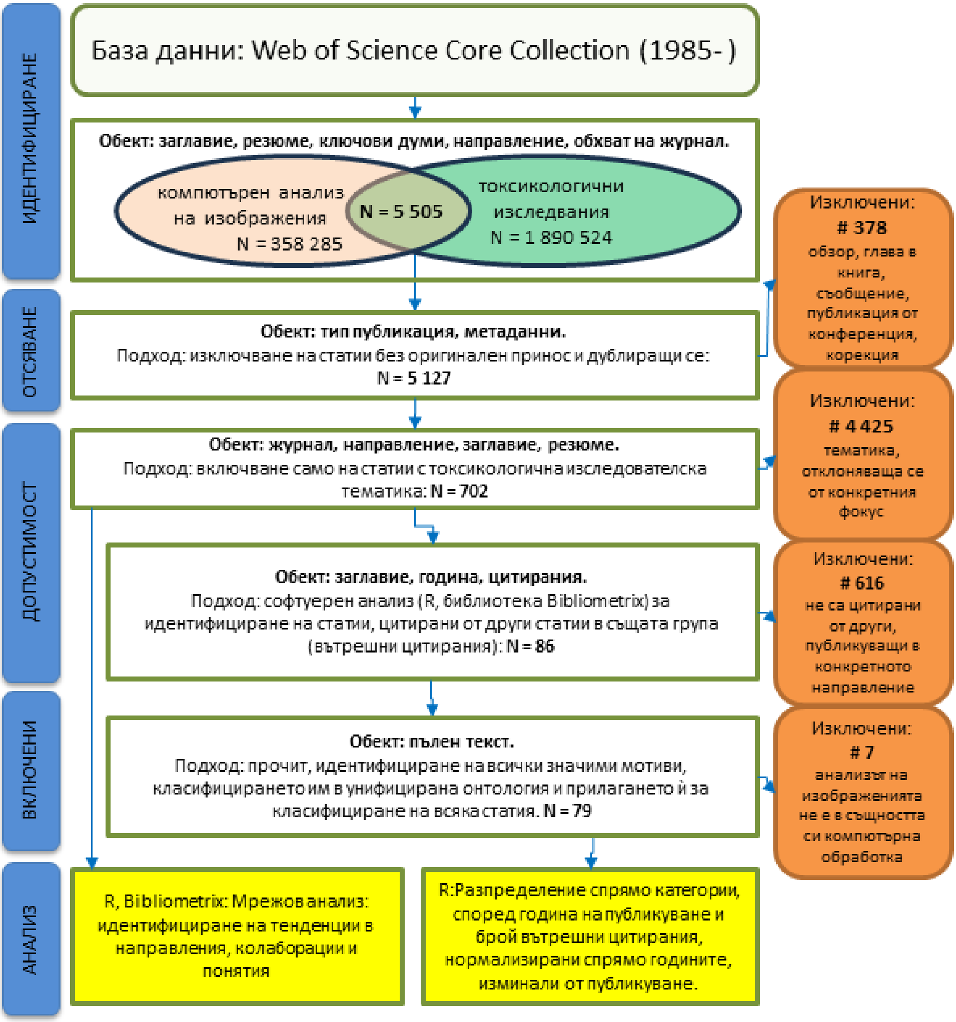
забележи, че всъщност определено решение е изкривено поради натрупване на артефакти, поради голям брой обучителни изображения с трудно забележим с просто око дефект в оптиката.

СИСТЕМАТИЧЕН ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Изложеният по-долу систематичен анализ дава възможност за постигане на обективност при изграждането на представа за тенденциите по отношение на приложенията на методите за анализ на биоизображения в експерименталните токсикологични изследвания.

Методология

Систематичният обзор е проведен по методологията, представена във Фигура 18. Целта е да бъде идентифицирана и подбрана само публикационна информация, която е достатъчно пълна по отношение на метаданните. По тази причина е използвана единствено базата данни Web of Science (WoS) Core Collection с достъпните в нея индекси на цитирания: Science Citation Index Expanded, Social Sciences Citation Index, Arts and Humanities Citation Index, Conference Proceedings citation index – Science/ Social Science & Humanities, Book Citation Index – Science/ Social Sciences & Humanities, Emerging Sources Citation Index, Current Chemical Reactions и Index Chemicus. WoS Core Collection се отличава с коректно въведените, изчерпателни и надлежно унифицирани ключови думи, научни направления, резюмета и индекси на цитирания[136]. Това позволява да бъдат изградени логически взаимовръзки между отделните записи и те да бъдат разглеждани като цялостна мрежова единица. Така, чрез библиометрични анализи на събраната информация могат бъдат идентифицирани най-важните тенденции по темата.



Фигура 18. Диаграма на приложената методология при идентифицирането, извличането, подбора и анализите на научните публикации по избраната тема.

В WoS Core Collection са включени само публикации след 1985 г. Това не е от значение по отношение на изследваната тема, защото нейната актуалност е свързана с достъпността на

персоналните компютри с капацитет за анализ на изображения, а тя е пренебрежима преди изследвания период. През 1989 г. Verwer et al. [137], съобщават, че анализите на изображения и персоналните компютри вече не са несъвместими понятия след появата на IBM-PC (модел 5150, пуснат на пазара през 1981 г.) и Macintosh II (пуснат на пазара през 1987 г.). Малко вероятно е публикациите с приложна насоченост към анализи на изображения преди 1985 г. да имат ключово значение. Това предположение е проверимо и на базата на наличната информация, извлечена според настоящата методология (Фигура 18). За всички записи на публикации са налични пълни библиографски списъци без ограничение на годината на публикуване на цитираните източници. Дори в селектирания списък да отсъстват важни публикации, се предполага, че разработки от тях биха послужили за основа и съответно, цитирани от последващи статии, които попадат в периода от 1985 г. до сега.

Ниво (I) на селекция: публикации, споменаващи понятия с отношение към темата

Обследването на базата данни включва първоначално идентифициране на по-широк кръг публикации и последващо прилагане на серия от филтри за постигане на качество и конкретика. Темата на настоящия обзор е пресечната точка на две научни направления. Затова първо са идентифицирани поотделно публикациите по съответните две широки направления: (1) в сферата на токсикологията и (2) на компютърното зрение и анализ на изображения. За търсенето са използвани логическите оператори „И“ (“AND”), „ИЛИ“(“OR”), „БЛИЗО“(“NEAR”, за близко разположение на думи в теста) и за търсене на части от дума, “*“. С тяхна помощ са приложени комбинации от критерии за идентифициране на въпросните

общи направления посредством търсене на думи в заглавия, списъци с ключови думи и резюмета (абстракти). По отношение на анализа на изображения, критериите са: “(**image NEAR analys*) OR (computer NEAR vision)**”, а по отношение на токсикологията: “**(toxi*) OR (poison* OR overdos* OR (adverse NEAR effect*) OR (adverse NEAR reaction*) AND drug)**”. Идентифицирани са 1 890 524 публикации, свързани с токсикология (1) и 358 285 публикации, свързани с анализ на изображения (2). В пресечната им точка попадат 5505 статии, които имат отношение едновременно към двете общи направления. Записите за тези публикации и съдържащите се в тях метаданни са актуални към 12.1.2024 г., когато са изтеглени от WoS Core Collection и проведените библиометрични анализи отразяват състоянието на проблема към тази дата.

Анализ (I): водещи софтуерни продукти и AI

Първоначалната селекция от 5505 записа, свързани едновременно с токсикология и анализ на изображения съдържа информация за документи с широк тематичен обхват. Най-цитираните документи измежду тях акцентират върху наноразмерни лекарство-доставящи системи[138], обезитет при онкологични заболявания[139], технологията „орган на чип“[140], 3D клетъчни култури[141], CAR T клетки[142] и др. Повечето от тях включват методи за анализ на изображения, които биха могли да имат токсикологично приложение, но са приложени с различна насоченост. Тъй като софтуерните продукти обикновено целят сравнително широка функционалност, изследването за това кои от тях са популярни е проведено именно в този широк контекст, преди да е стеснен кръгът от публикации чрез последващи филтри, които елиминират статиите без токсикологична насоченост. През последните години анализът на изображения е доминиран от приложения на AI и поради това са разгледани и

фракциите от документи, споменаващи конкретен софтуерен продукт, които споменават едновременно и понятия, свързани с AI (“AI”, “artificial intelligence”, “machine learning”, “deep learning”) и/или с анализи на изображения и токсикология (Таблица 4). Софтуерните инструменти от интерес са подбрани при предварителна литературна справка и са представени по-подробно в друг раздел на този труд. Съвпадения между софтуерни продукти и темата анализ на изображения в токсикологията се откриват само по отношение на CellProfiler – 3.0 %, ilastik – 1.3 %, QuPath – 0.5 %, ImageJ (или FIJI) – 0.2 %, OpenCV – 0.2 % и MATLAB – 0.01%. При някои от тези софтуерни продукти, припокриването с темата AI е 100%, тъй като са разработени специално за такива приложения. Такива са DeepLabCut, ilastik, PathML, ZeroCostDL4Mic, CDeep3M и ImJoy. Висок процент, но не пълно припокриване с темата „AI“ се наблюдава и при KNIME (62%) и Orbit image analysis (36%), Scikit-image (23%), CellProfiler (18%), QuPath (17%) и OpenCV (16%). От въпросните софтуерни приложения, асоциирани с AI, едновременно съвпадение и с тематиката анализ на изображения и токсикология има при CellProfiler, ilastik, QuPath и OpenCV. Тези софтуерни продукти изглежда са успешно адаптирани към тенденцията за интегриране на AI и едновременно с това вече са били прилагани за анализи на изображенията за целите на токсикологията. ImageJ и MATLAB са водещите софтуерни продукти за научни анализи на изображения, наложили се в рамките на повече от две десетилетия и споменати съответно в 19 430 и 147 139 записа в анализираната база данни. При такова широко приложение е нормално фракцията от записи, която споменава и анализ на изображения в токсикологията да е относително ниска. Ако обаче отнесем фракцията не към всички статии, споменаващи софтуера, а спрямо всички статии, споменаващи анализа на изображения в токсикологията, се разкрива друга тенденция. Разглеждането на броя, а не на фракциите показва, че измежду

първоначалните 5505 статии, най-много споменават ImageJ/FIJI (51), последван от Matlab (21), CellProfiler (8) и OpenCV (4) (Таблица 4). Повечето публикации, споменаващи ImageJ/FIJI и

MATLAB са публикувани преди повече от десетилетие, когато AI беше по-малко популярна тема и по-ниската фракция на съвпадение с нея не е задължителна индикация, отсъства процес на адаптация към подобни приложения[143,144]. Броят публикации, споменаващи AI и Matlab или AI и ImageJ/FIJI е висок (съответно 4402 и 518). При изместване на перспектива на сравнение към фракцията от записите, споменаващи анализ на изображения и едновременно AI, е видно, че те са 12%, а фракцията от споменаващите анализи на изображенията, насочени в областта на токсикологията и AI е 5%. Това наблюдение потвърждава, че експерименталната токсикология е дисциплина с присъщ консерватизъм.

Таблица 4. Съвпадение на статии с повече от една ключова дума в търсене в WoS CoreCollection. В най-лявата колона са написани всички приложени ключови думи. От ляво на дясно, в третата колона са показани бройките на статии, при които има едновременно съвпадение на ключовите думи, обозначаващи анализа на изображения в токсикологията, в четвъртата колона, бройките статии със съвпадение между анализ на изображения в токсикологията и изкуствен интелект (AI/ML/DL). В пета колона са дадени съвпаденията от трета колона в процентно изражение, а в шеста колона – съвпаденията от четвърта колона в процентно изражение. Последните две колони са цветево кодирани, така че стойностите, като 0 – червен цвят, 100 – зелен цвят и нюанси между тях.

понятие	брой статии	& анализ токс. изобр. брой статии	& AI брой статии	%& анализ токс. изобр.	% &AI
Toxicology	1735261	5505	23682	0.32	1.36
AI/ML/DL	1243649	291	1243649	0.02	100
Image analysis	358285	5505	41491	1.54	11.58
Toxicological Image analysis	5505	5505	291	100	5.29
Matlab	147139	21	4402	0.01	2.99
ImageJ/FIJI	19430	51	518	0.26	2.67
NumPy	4132	0	404	0	9.78
SciPy	3274	0	210	0	6.41
knime	3111	0	1946	0	62.55
OpenCV	2543	4	419	0.16	16.48
OMERO	360	0	12	0	3.33
CellProfiler	265	8	49	3.02	18.49
Galaxy platform	236	0	16	0	6.78
QuPath	212	1	37	0.47	17.45
DeepLabCut	146	0	146	0	100
Napari	116	0	9	0	7.76
Scikit-image	84	0	19	0	22.62
ilastik	76	1	76	1.32	100
Icy	18	0	1	0	5.56
Orbit image analysis	11	0	4	0	36.36

PathML	3	0	3	0	100
ZeroCostDL4Mic	3	0	3	0	100
CDeep3M	3	0	3	0	100
ImJoy	2	0	2	0	100

Ниво (II) на селекция: оригинални токсикологични публикации

Следващите анализи целят да разкрият публикационната структура и тенденциите, свързани с установените досега практики при анализ на изображения в експерименталната токсикология. За да е обективна количествената и качествена библиометрична оценка, върху първоначалната селекция от 5505 записа на публикации са приложени допълнителни критерии. За да се избегне изкривяването на последващите анализи от вторични споменавания, от селекцията са премахнати 307 обзорни статии и други 71 публикации, включващи глави от книги, съобщения, публикации от конференции и една библиография, след което остават 5127 публикации.

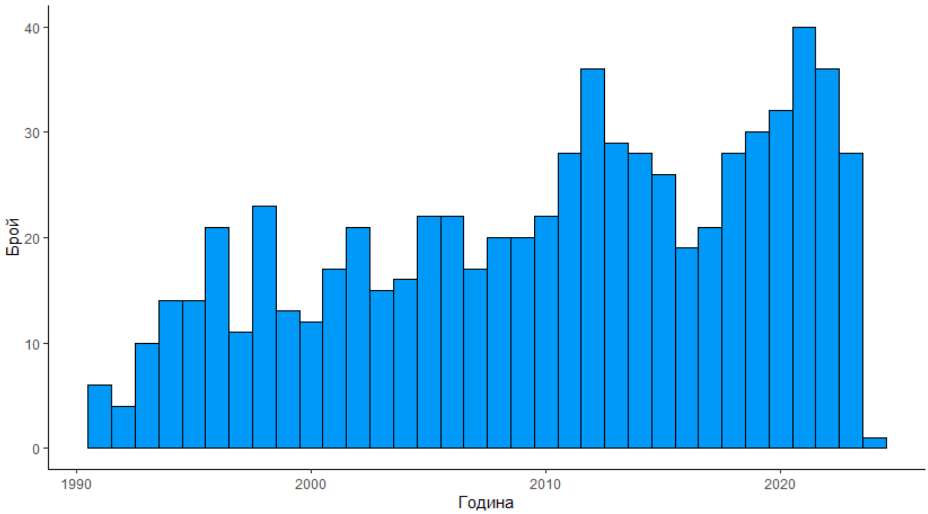
В получената селекция все още голяма част от публикациите не са с токсикологична насоченост. Затова е приложен допълнителен критерий, допускащ само публикации, определени като токсикологични според разширената категоризация, разработена от WoS. Идентифицирани са 702 оригинални научни публикации с изцяло токсикологична насоченост, които са подходяща и солидна основа за последващите библиометрични анализи на конкретната тема от интерес (Фигура 18).

Анализи (II)

Анализите са проведени с помощта на R[145,146] и библиотеката Bibliometrix[147].

Времеви обхват

Анализиран е списъкът от 702 публикации, идентифицирани след приложение на гореописаните филтри. Периодът, в който са публикувани въпросните записи е между 1991 и 2024 г. (Фигура 19).



Фигура 19. Хистограма на разпределението на публикациите в списък А702 според годината им на публикуване.

Разпределението по години разкрива динамика на публикуване, отразяваща еволюцията на изследваната приложна област. Достъпността до хардуер и подходящ софтуер са *conditio sine qua*

поп и приносът им за провеждането на анализи на изображения и наблюдаваното разпределение е безспорен.

Персоналните компютри навлизат в академичните институции през 1980-те. От 1992 г. се наблюдава стабилен ръст в продажбите[148] и разпространението им. Именно в този период са публикувани първите статии по интересуващата ни тема.

Анализ на литературата в PubMed Central[149] показва, че през последните три десетилетия се наблюдават два периода с тенденция за значителен ръст в дела на научните публикации, съобщаващи, че е използван софтуер. До 1996 г. делът на такива публикации е незначителен (под 5 %). През 1997 г. се наблюдава рязко увеличение (до около 15 % от всички публикации), като до 2001 година ситуацията остава непроменена. От 2001 до 2008 г. отново се наблюдава ръст, достигащ до 55 %. От тогава до сега има едва забележимо плавно увеличение, като са достигнати около 70 % през 2022 г.

Описаните глобални тенденции съвпадат с наблюдаваната динамика на публикациите по темата до 2010 г. (Фигура 19). В периода 1996-1998 година се забелязва първото драстично увеличение в броя на публикации по темата с последващ плавен ръст, макар и по-нисък от глобалния, до към 2010 г. Последващата динамика не може да бъде обяснена с глобалните тенденции между 2010 и 2022 г. Между 2011 и 2013 г. се наблюдава рязко увеличение на публикациите за приложение на анализи на изображения в експерименталната токсикология, последвани от рязък спад и втори, още по-изразен пик, формиращ се между 2017 и 2021 г., след което се наблюдава втори спад.

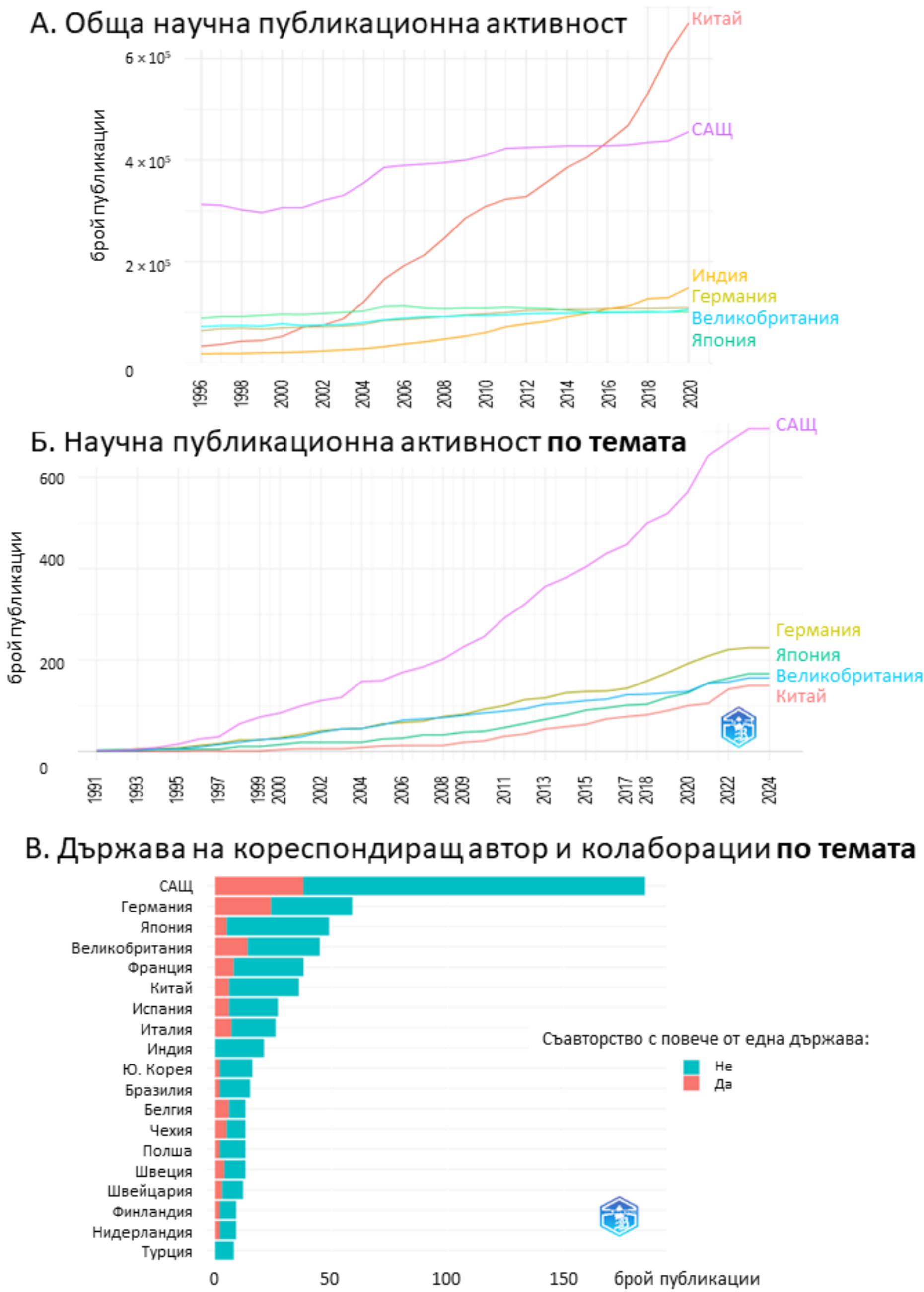
Периодът на първия пик съвпада с въвеждането на най-голямата свободнодостъпна софтуерна колекция за анализи на изображения, FIJI[89] и демократизирането на дигиталната

патология в този период[150], а вторият – със създаването на дълбоката невронна мрежа U-net от Ronneberger et al.[151] във Фрайбургския университет, което е свързано със скок в ефективността при обработка на изображения с AI. Повече детайли за тенденциите ще бъдат разкрити в последващите анализи.

Географско разпределение

Интензивната публикационна активност и афилиацията на авторите не са гаранция за качество. Въпреки това, системните усилия, насочени в посока проучваната тема, са признак за сериозно отношение и наличие на предпоставки за развитие на конкретното методологично направление. Информацията за географското разпределение и звената с висока публикационна активност по темата е обобщена и контекстуална, но обективна. Тя може да послужи като отправна точка при намерение за установяване на международни колаборации и партньорства или при търсене на обучителни курсове. Освен това, тази информация поставя в контекст последващите анализи. Без поглед върху обобщената картина е трудно да бъдат забелязани изключения и открояващи се елементи, а може да се очаква, че те притежават интересни и качествено различни характеристики. Сравнението с базовата публикационна активност по всички направления показва дали и активността по конкретната тема за съответната държава е резултат на наличието на цялостно

Фигура 20. Времеви диаграми на общата публикационна активност (А.), и тази, свързана с темата токсикология и анализ на изображения (Б.) по отношение на най-представените държави и разпределение структура на публикационната активност на най-представените държави по отношение на процента международни колаборации.[147]


А. Обща научна публикационна активност
брой публикации
0
2×10^5
4×10^5
6×10^5
1996 1998 2000 2002 2004 2006 2008 2010 2012 2014 2016 2018 2020
Китай
САЩ
Индия
Германия
Великобритания
Япония
Б. Научна публикационна активност **по темата**
брой публикации
0
200
400
600
1991 1993 1995 1997 1999 2000 2002 2004 2006 2008 2009 2011 2013 2015 2017 2018 2020 2022 2024
САЩ
Германия
Япония
Великобритания
Китай
В. Държава на кореспондиращ автор и колаборации **по темата**
САЩ
Германия
Япония
Великобритания
Франция
Китай
Испания
Италия
Индия
Ю. Корея
Бразилия
Белгия
Чехия
Полша
Швеция
Швейцария
Финландия
Нидерландия
Турция
Съавторство с повече от една държава:
Не
Да
0
50
100
150
брой публикации

функционална инфраструктура или може да се каже, че темата е в известна степен приоритизирана.

Базовата публикационна активност на държавите - лидери в световен мащаб показва два различни профила (Фигура 20 А). При западните държави и Япония се наблюдава постоянно ниво на публикационна активност с минимален ръст през последните две десетилетия, докато при Индия и много по-изразено при Китай, се наблюдава непрекъснат ръст на годишния брой публикации за същия период. За разлика от общата публикационна активност, по отношение на публикациите по конкретната тема, тенденциите са различни (Фигура 20 Б). Има ръст на броя на публикациите по темата във всички разглеждани държави. Китай, който от 2016 г. досега е световен лидер по общ брой публикации, по конкретната тема е на пето място. Индия, която понастоящем е трета по обща публикационна активност, е на девето място по публикации по темата. САЩ има изразен превес пред Германия, Великобритания и Япония както по отношение на общите публикации, така и по темата. Германия, Великобритания и Япония имат много сходна и почти непроменена обща годишна публикационна активност през последното десетилетие, но по отношение на темата, от 2017 до момента, Германия се откъсва и значително изпреварва Япония и Великобритания. Резултатите показват, че сред държавите с най-голяма научна продукция, експерименталната токсикология, интегрираща методи за анализ на изображения вероятно е приоритизирана в Германия и обратно, интересът по темата е сравнително нисък в Индия и Китай. В САЩ, Япония и Великобритания развитието на конкретната приложна област следва общите темпове на научна публикация. Наблюдаваните тенденции вероятно са свързани с развитието на по-общата приложна област на анализа на биоизображения.

Публикационната активност по темата по държави може да бъде разгледана и от гледна точка на наличието на трансгранично

сътрудничество, изразяващо се в съавторство от повече от една държава. Германия се отличава с най-висок относителен дял на международни публикации, надхвърлящ една трета от публикациите им по темата (Фигура 20 В). Може да се предположи, че в интердисциплинарна сфера като експерименталната токсикология, интегрираща методи за анализ на изображения, участието в трансгранични колаборации е перспективна стратегия.

Водещи изследователски звена

Този анализ показва наличието на обособени водещи центрове в държави извън най-активно публикуващите. Очаквано, от данните за активността по темата по държави, най-представените институции в селектирания списък с публикации се намират в САЩ (Фигура 21). Останалите водещи звена се намират в Швеция и Испания, които са съответно на петнадесето и шесто място сред държавите с най-голям брой публикации по темата.

Водещото звено с най-много публикации по темата към момента е Университетът на щата Мичиган. Там се наблюдава непрекъсната активност по темата през последното десетилетие, като практическата насоченост е широкообхватна и включва дигитална патология[152], обща[153] и неклинична токсикология[154]. В публикациите детайлно се описва валидирането на протоколите. Въпросните протоколи са свързани с анализ на характеристиките на мастни капки в култури на 3T3-L1 адипоцити чрез CellProfiler[155], анализ на чернодробна стеатоза и фиброза в дигитални слайдове със срезове от миши черен дроб чрез MATLAB[156] и определяне на влиянието на преаналитичните фактори при анализа на дигитални слайдове[152]

Друго звено, което последователно прилага методи за анализ на изображения за токсикологични цели през последните три

десетилетия, е Националната лаборатория за изследване на въздействия върху здравето и околната среда (NHEERL) към Американската агенция за опазване на околната среда (EPA). Техните проучвания също обхващат дигитална патология, обща[157] и неклинична токсикология[158]. В последно време са валидирали ResNet[159] невронна мрежа за идентифициране на кардиотоксичност в плъши дигитални слайдове с помощта на библиотеката Caffe[160] и алгоритъма Adam[161].

Солиден и постоянен принос към общата[162], еко-[163] и репродуктивна [164]токсикология, с помощта на методи за анализ на изображения, има Упсалският университет в Швеция. Това е звено с традиции в експерименталната токсикология. Там, през 1984 г. Östling и Johansson описват кометния тест за пръв път[165]. Наскоро, изследователи от Лабораторията по екотоксикология в Упсалския университет публикуват валидирането на *ин витро* протокол за определяне на невронална ембриотоксичност върху SH-SY5Y клетъчна линия по време на диференциация, като комбинират анализ на изображения на неврити чрез CellProfiler с анализ на транскриптомни данни[166].

През последните няколко години от Университета на Ню Мексико произлизат най-много публикации по темата. Техните изследвания са предимно в областта на въздействието на микрочастиците, репродуктивната токсикология[167] и екотоксикологията[168]. През последната година са публикували проучване за генотоксичност на микросфери, определена чрез маркера γ-H2AX (фосфорилиран хистон H2AX) и за ефекти върху клетъчната пролиферация чрез маркера FAK (focal adhesion kinase) върху флуоресцентни микрографии на A549 клетки от белодробен карцином[168]. Друго изследване от същия период описва проучване за кластогенни ефекти на бисфеноли върху C18-4 сперматогонии чрез определяне наличието и характеристиките на многоядрени клетки със CellProfiler[167].

Сред водещите звена по темата с историческо значение е и Университета на Баска автономна област, където в периода 1998 до 2006 година се прилагат анализи на изображения в основополагащи изследвания в областта на общата[169] и екологична токсикология и значението на мембранните органели на морски мекотели при експозиция с токсиканти[170]. Напоследък изследователи от това звено са публикували валидирането на автоматизиран анализ за екотоксичност чрез оценка на ембрионални изменения в морски таралежи с помощта на машинно обучение с MATLAB[171].



Фигура 21. Тенденции във времето по отношение на афилиацията на авторите, публикуващи по темата по години. [147]

Най-активни автори

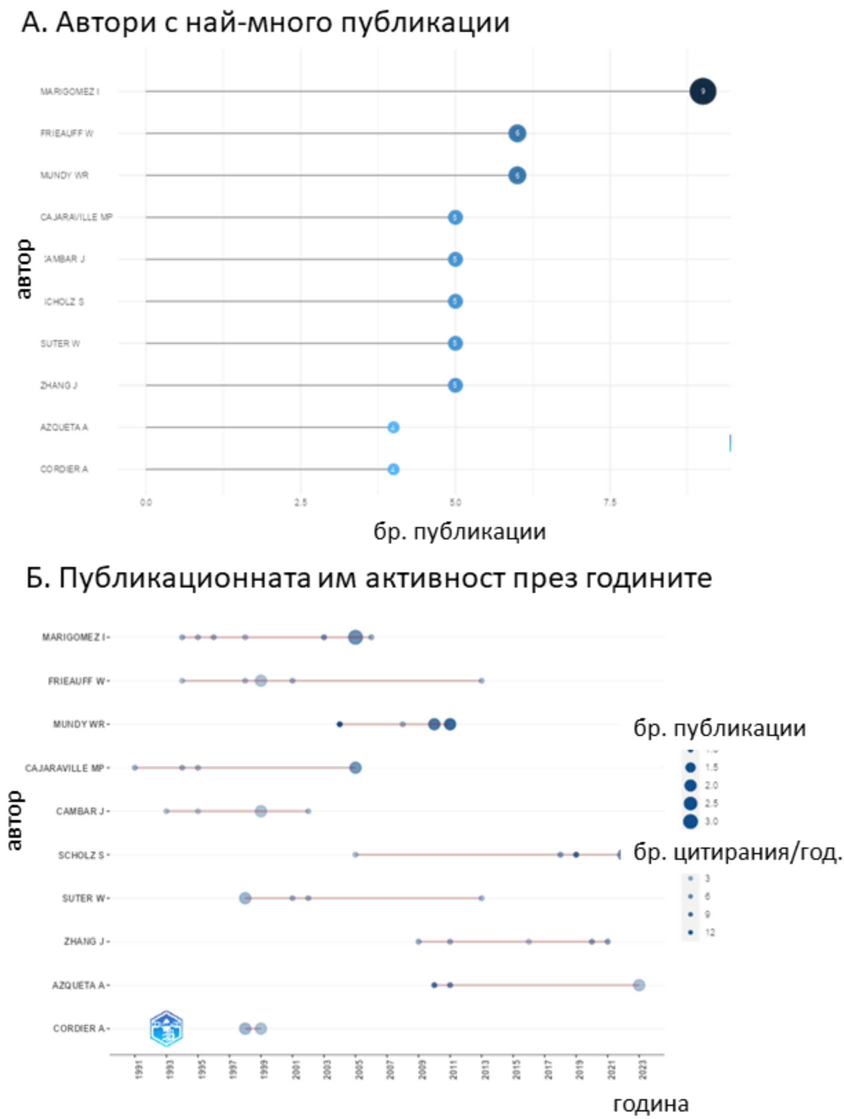
След като са разгледани държавите и звената, които се отличават с най-много публикации, интегриращи анализи на изображения в токсикологията, вниманието ще бъде насочено и към най-активните автори и групи от автори, прилагащи такива методи. Някои от тях са афилиирани към горепосочените звена, а други

са изключение от генерализацията на географски и институционален признак.

Авторът с най-голям брой публикации по темата е Ionan Marigómez от Лабораторията по клетъчна биология и хистология към Департамента по зоология в Университета на Баската автономна област (Фигура 22 A). Той е съавтор в публикации по темата между 1991 и 2006 г, като фокусът им е върху влиянието на замърсяване на околната среда с тежки метали и влиянието им върху лизозомни маркери в храносмилателната система на миди[170]. Miren Cajaraville, която също е сред десетте най-активни автори по темата, е афилиирана към същата група като Ionan Marigómez, като има в голяма степен припокриване на публикациите им.

На второ място по публикационна активност, с равен брой публикации по темата, са Wilfried Frieauff и William Mundy. Wilfried Frieauff работи в лабораториите по лекарствена безопасност на Сандоз и Новартис в Базел, Швейцария между 1994 и 2013 година. Изследванията му са свързани с тестове за генотоксичност, като теста за микроядра[172] и кометния тест[173]. Публикационната активност на Willi Suter до голяма степен се припокрива с тази на Wilfried Frieauff. Заедно с André Cordier, те са сред авторите с най-голяма публикационна активност, но това се дължи на съавторство в едни и същи публикации. André Cordier участва като техен съавтор в периода 1998-1999 г.

Другият автор, който дели второ място по брой публикации по темата, е William Mundy. Той има разработки по темата между 2004 и 2011 година, като е афилииран към NHEERL към EPA. Обект на изследванията му са *ин витро* модели за скрининг на



Фигура 22. Автори, подредени по низходящ ред по отношение на броя публикации по темата (А.), както и разпределение на публикациите по темата във времето по брой за година (големина на сините сфери) и брой цитирания (цвят).

невротоксичност, при което въвежда методи за определяне на морфометрични параметри на неврити[174].

Следващите пет автори в списъка (Фигура 22) имат еднакъв брой публикации, като Stefan Scholz и Jie Zhang са активно публикуващи по темата през последните няколко години. Преглед на публикациите на Zhang, обаче показват, че присъствието в този списък се дължи на съвпадение на имената на повече от един изследовател. Stefan Scholz работи в Департамента по биоаналитична екотоксикология към Хелмхолц център за изследвания на околната среда в Лайпциг. Изследванията му се разпростират между валидиране на *ин витро* и *ин виво* модели като Danio rerio (риба зебра) за скрининг за репродуктивна токсичност[175] и ендокринни нарушения[176], морфометричен анализ на неврити в SH-SY5Y невробластомни клетки[177] и кинетика на натрупване на химични вещества в клетките[178]. Напоследък, работата му включва приложение на методи, базирани на машинно обучение[175,179].

Сред първите десет най-активни по темата е и Amaya Azqueta, афилиирана към Университета в Памплона и по-късно в Университета в Осло. Нейната публикационна активност по темата е посветена на валидирането[180] и оптимизирането[181,182] на кометния тест.

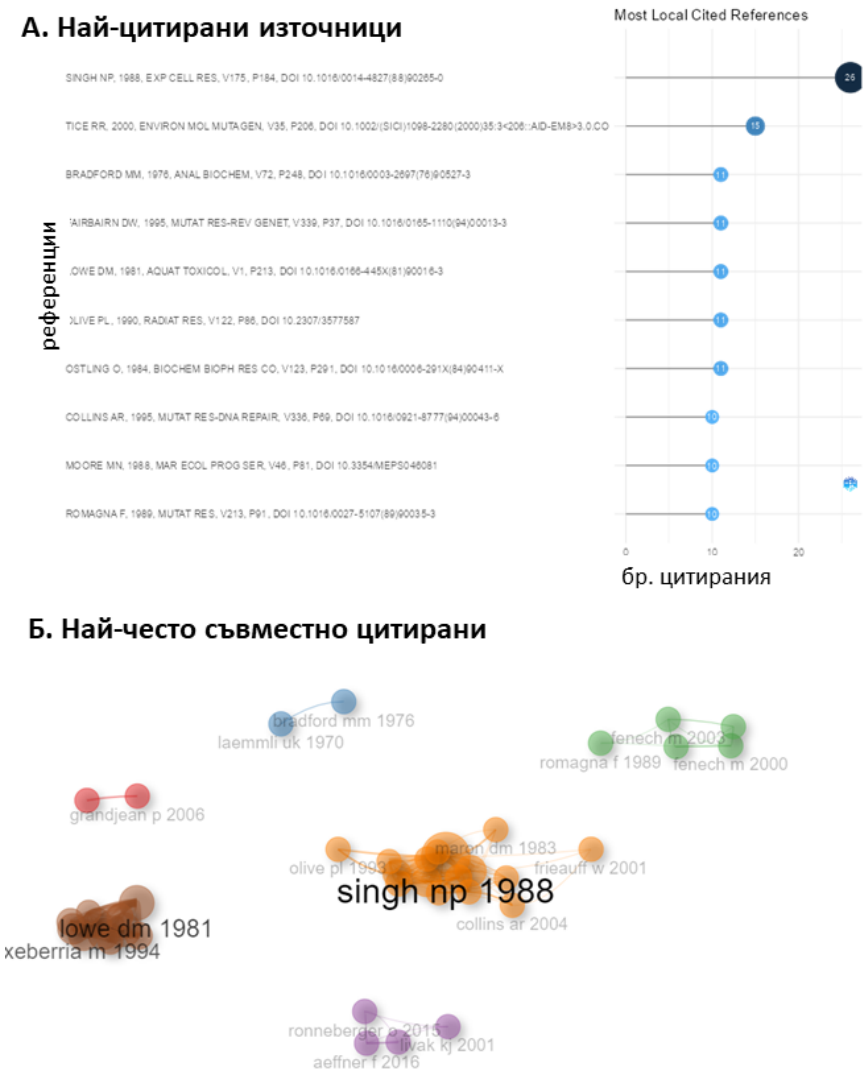
Jean Cambar през 1990-те години прилага анализи на изображения при изследвания на тежки метали и техните вазореактивни и нефротоксични ефекти. Афилииран е към лабораторията по клетъчна биология към Фармацевтичния факултет в Университета в Бордо[183].

Ключови концепции

Всяка експериментална разработка стъпва върху определени теоретични и методологични основи, които предоставят

отправни точки за осмисляне на адресирания научен проблем и досегашното познание. По този начин, предишният опит помага да бъде получена нова информация. Установена практика е оригиналните и основополагащи концепции да бъдат цитирани при обосновката на научни публикации. Така, разглеждайки цитираната литература (списък с референции) в статиите от дадено научно направление, прави впечатление, че има повторяемост в споменаването на някои референции или групи от тях. Често те са свързани с прилаганата методология или основополагащи теоретични конструкти. Групирайки публикациите спрямо степента на припокриване и сходствата в референциите, може да разберем много за сходствата по отношение на целите им. Чрез преглед на най-често повтарящите се единични или групи от референции, основната концепция, обединяваща всяка сформирана група (клъстер) от публикации може да бъде идентифицирана. Така, библиометричният анализ може да разкрие концептуалната структура и поднаправленията в публикациите по темата.

С помощта на R[145] и библиотеката Bibliometrix[147], са идентифицирани референциите, които се срещат най-често в публикации по темата и са групирани спрямо честотата на едновременното им споменаване. Очертават се шест клъстера от съвместно цитирани референции (Фигура 23 Б). Най-често цитираната референция в статии по темата е тази, сочеща към публикацията на Singh et al (1988)[184], описваща най-популярната модификация на кометния тест (Фигура 23 А). Тя е и в основата на най-големия клъстер от референции (представен с оранжев цвят във Фигура 23 Б).



Фигура 23. Най-често цитирани референции в статиите по темата (А.) и клъстери от съвместно споменавани цитирания (Б.).Големината на кръга показва честотата на цитиране, а цветът – принадлежността към определен клъстер[147]

Сред десетте най-цитирани референции, общо шест спадат към него[165,184–188]. Сред тях е и статията на Tice et al. (2000)[185], която е втора по брой цитирания по темата на анализа. Тя описва работата на експертния панел към OECD, разискващ стандартизирането на протокола за кометния тест за регулаторни цели. Други многократно цитирани референции в този клъстер са основополагащата статия на Ostling и Johanson (1984)[165], в която за пръв път е описан кометният тест, статията на Olive et al. (1990)[187], в която за пръв път е приложен софтуерен анализ[189] на „кометите", обзорите по темата на Fairbairn et al. (1995)[186] и McKelvey-Martin et al. (1993)[190] за методологичните вариации, описанието на разликите, степента на поправка на ДНК при различни типове клетки от Collins et al. (1995)[188] и първият комплексен протокол за автоматизирано заснемане и софтуерен анализ на „кометите", описан от Frieauff et al. (2001)[173]. Клъстерът включва и референции към други методи за тестване на генотоксичност. Такива са статията на Maron и Ames (1983) [191], описваща т.нар. тест на Ames и тази на Collins et al (2004)[192], описваща 8-оксо-7,8-дихидрогуанин като маркер за оксидативно увреждане на ДНК.

Сред най-цитираните референции извън темата за генотоксичност е тази на Lowe et al. (1981)[193], показваща че наличието на липофилни екотоксиканти води до изменения в лизозомите в клетките на храносмилателната система на миди. Тя е в основата на втория по големина клъстер (с кафяв цвят във Фигура 23 Б), фокусиран върху екотоксикология и лизозомни изменения при мекотели. Клъстерът е компактен, като всички референции, включително статиите на Moore (1988)[194] и Etxreberria et al. (1994)[195] засягат същата тематика. Може да бъде направена ясна връзка между въпросните референции и публикациите на групата на Marigómez от Университета на Баската автономна област.

Измежду най-цитираните референции е и тази на Bradford et al. (1976)[196], описваща и досега популярен метод за количествено определяне на протеини. Тази референция най често е цитирана в комплект с Laemmli (1970)[197], които пък описват метод за разделяне на протеини на базата на молекулната им маса. Тези концепции са основополагащи по отношение на биохимията и всички приложения на съвременната механистична токсикология и сформират своеобразен малък клъстер (със син цвят във Фигура 23 Б).

Референцията към Romagna и Staniforth (1989)[198] също е сред десетте най-цитирани. В основата е на следващия по големина клъстер (със зелен цвят във Фигура 23 Б). Авторите на тази публикация работят в същото звено по лекарствена безопасност в Sandoz Pharma Ltd. с Wilfried Frieauff[199], който на по-късен етап автоматизира и кометния тест[173]. Всички референции от този клъстер са свързани с теста за микроядра, като статиите на Fenech et al. (2000)[200] и (2003)[201] предоставят насоки за стандартизиране на критериите за класификация на типа клетъчно увреждане спрямо микроядрата, а Diaz et al. (2007)[202] и Decordier et al. (2008)[203] валидират протоколи за автоматизирани анализи на микроядра в изображения.

Следващият по големина клъстер (с виолетов цвят във Фигура 23 Б), не съдържа референции сред десетте най-често цитирани в публикации по темата. Това не е свързано с по-малка значимост, а статиите са от по-скорошен период. Клъстерът е базиран около статията на Livak et al. (2001)[204], описваща PCR метод за количествен анализ на генна експресия. Тази референция най-често е цитирана съвместно с публикациите на Aeffner et al (2016)[205] и (2017)[206], обсъждащи прехода от конвенционална към дигитална патология. На този клъстер принадлежи и публикацията, описваща дълбоката невронна мрежа U-Net[126].

Друг малък клъстер (с червен цвят във Фигура 23 Б) е този, базиран на референцията към Grandjean et al. (2006)[207], които описват ефектите на пренаталната експозиция с пестициди върху невропсихологическото развитие на деца от Еквадор. Другата референция в този клъстер сочи към Moors et al. (2009)[208], които описват култивирането на сфероиди от човешки неврални прогениторни клетки като модел за определяне на невро и ембриотоксичност.

Мрежовият анализ на най-често съвместно цитираните референции показва, че водещо историческо значение на токсикологията, интегрираща анализи на изображения има кометният тест, последван от екотоксикологичните тестове за лизозомални изменения в мекотели и тестът за микроядра. Споменаването на базовите тестове за определяне на протеини демонстрират преходът на експерименталната токсикологията от емпиричен към механистичен подход. *Ин витро* тестовете за невротоксичност и ембриотоксичност също имат важна роля. Клъстерът с най-актуални референции е свързан с дигиталната патология, методите за определяне на нива на експресия и приложението на конволюционни невронни мрежи като U-net[209].

Ниво (III) на селекция: най-значими публикации по темата

Гореописаните анализи (I и II) позволяват да бъдат очертани основните акценти и отговорите на въпросите „Кой?“, „Къде?“, „Кога?“ и „Какво?“, но само частично засягат въпроса „Как?“. Информацията в записите на статиите (метаданни) не е достатъчна за това. Необходима е подробна и едновременно с това, унифицирана информация, която се съдържа в самите данни или пълните текстове. Трудно, времеемко и неефективно е да бъде приложен подобен задълбочен подход към стотици

пълни текстове. Оптималното решение е да бъде идентифицирана подгрупа от умерено голям брой публикации с централно значение, които да бъдат щателно разгледани, обработени и едва след това, анализирани в съвкупност.

Върху селектираните (II) по-рано 702 източника е приложен допълнителен филтър за идентифициране на оригиналните изследвания с най-важен принос в тази специфична приложна и методологична област. Библиометрията определя приноса спрямо цитиранията от други автори. Приносът може да се разпростре и в други научни направления. За целите на настоящото проучване от значение е отзвукът в работата на други токсиколози, прилагащи анализи на изображения. По тази причина, критерият за подбор е наличие на поне едно цитиране от друга публикация измежду селекцията (II) с публикации по темата (вътрешно цитиране). Вътрешните цитирания са установени чрез анализ на референциите на всички записи (II) чрез R[145,146] и библиотеката Bibliometrix[147]. Идентифицирани са 86 публикации, отговарящи на зададения критерий. След първия преглед (в контекста на следващите анализи (III)), от получената извадка от 86 публикации са премахнати още 7 публикации, в които се споменава анализ на изображения без обаче да се прилагат характерните софтуерни алгоритми, представляващи по същество компютърна обработка на изображения.

Анализи (III)

За да бъдат идентифицирани най-значимите концепции по отношение на темата, първо са разгледани публикациите с най-много вътрешни цитирания на година откакто са публикувани, а след това са разгледани най-разпространените концепции измежду публикациите в селекцията.

При първия преглед на пълните текстове в селекцията (III) от 79 най-значими публикации (Таблица 5), е създаден списък с понятия, които кратко и конкретно описват целите, методологията и приложените анализи на изображения за всяка една от тях. След това, цялата съвкупност от понятия е унифицирана и йерархично класифицирана под формата на онтология, описана по-долу в труда (Фигура 25). Пълните текстове са прегледани още веднъж, при което списъкът с понятия, описващи всяка статия е допълнен и приведен в пълно съответствие с онтологията.

Формулиран е алгоритъм в R[145,146], който за краткост и удобство при последващи анализи, задава уникален индекс на всяко понятие в онтологията (Фигура 25) и след това прилага съответните индекси към понятията, принадлежащи към описанието на всяка статия. Така, всяка статия бива описана освен с думи, и със съответните индекси (Таблица 5, най-дясна колона, „ID след преглед“). Може да бъде определено присъщото йерархично ниво на понятието и свързаните с него „родителски“, „дъщерни“ и „сестрински“ понятия след справка с онтологията. В резултат, селекцията (III) придобива вида на списък от статии, подлежащ на класификация спрямо различни критерии, заложени в нея. Вътрешните цитирания са предварително определеният признак за значимост на описаната концепция по отношение на въпросното направление. Съответно, селекцията (III) от публикации с вътрешни цитирания може да бъде разгледана като извадка на значимите концепции за направлението експериментална токсикология, интегрираща анализи на изображения. При прилагането на различни критерии към тази селекция (III), ако някои от дъщерните класове са по-често срещани от други, те вероятно имат и по-голямо влияние върху развитието на направлението за периода на анализа. Т.е. ако определен подклас е застъпен в по-голяма част от тези публикации, това е и признак за по-голяма значимост. Кодът за осъществяване на гореописаните операции и за

графичното представяне на разпределението спрямо съответните критерии (Фигури 26 до 34) е наличен в GitHub (Фиг. 24).

Фигура 24. QR код, препращащ към адреса на свободнодостъпна GitHub репозитория (github.com/YIYordanov/ToxImgAnBibl) и код с описаните алгоритми на библиометричната информация.

Публикации с най-много локални цитирания

Броят вътрешни цитирания е показател за значението на публикацията за изследваното тясно направление. При сравнение на вътрешните цитирания на скорошна публикация с тези на публикация отпреди десетилетия, най-вероятно втората ще е по-цитирана, без задължително това да означава, че първата е по-незначителна. За да бъде намалена тежестта на статии, които са били популярни за определен период от време и увеличена тежестта на актуални статии, е добавен още един параметър за сравнение – брой вътрешни цитирания, нормализирани чрез разделяне на годините, изминали от публикуване (Таблица 5, колона „цит./год.“).

Сред статиите с най-много годишни вътрешни цитирания, първите пет са публикувани в списанието „Токсикологична патология“ в рамките на последните шест години (Таблица 5). Същото важи за единадесет от първите петнадесет публикации, класирани по този критерий. Това показва, че приложението на анализи на изображения дава най-голям принос и има най-голямо отражение върху сферата на токсикологичната патология и дигиталната патология.

Темите, които тези публикации засягат, са свързани с особеностите на получаването, съхранението и анализа на

дигитални слайдове (сканирани цели хистологични слайдове), приложението на машинно обучение за анализа им и формулирането на регулаторни изисквания и стандарти за приложение на дигиталната патология за неклинични изпитвания[210,211].

Публикацията с най-голям брой вътрешни цитирания за година е тази на Pischon et al. (2021)[212], която прилага дигиталната патология и AI като инструменти за идентифициране на хепатоцелуларна хипертрофия, маркер и рисков фактор за негенотоксична карциногенеза. Афилиациите водят към няколко) фармацевтични компании, които разработват нови молекули.

Gauthier et al (2019)[210], Schumacher et al. (2021)[213], Long et al. (2013)[150] и Saravanan et al. (2017)[214] дискутират перспективите за интегриране на дигиталната патология в регулаторни документи като правилата на Добрата лабораторна практика. И тук, авторите са афилиирани към фармацевтични компании и такива, специализирани в областта на дигиталната патология.

Kuklyte et al. (2021)[211] сравняват представянето на различни конволюционни невронни мрежи за идентифициране на лезии в дигитални слайдове от различни органи. Афилииациите са към компании със същия профил.

Lindauer et al. (2019)[215] описват валидирането на модел за идентифициране на пролиферация с помощта на маркера Ki-67 в клетки на млечна жлеза на плъх като предпоставка за негенотоксична карциногенеза. И тук, авторите са афилиирани към фармацевтични компании.

Посочените примери показват, че има достатъчно голяма общност, която полага системни и целенасочени усилия за развитието на дигиталната патология. Направлението има висока приложна стойност и са налични ресурси за развитието

му. Това е видимо от факта, че водещите публикации произлизат от фармацевтични компании.

Сред публикациите, водещи спрямо годишните вътрешни цитирания, се наблюдават и такива на теми, различни от дигиталната патология. Те са представени по-долу по ред, съответстващ на публикацията с най-висок ранг със съответната насоченост.

Yin et al. (2020)[216] представят 3D *ин витро* модел на сперматогонии за идентифициране на репродуктивна токсичност. Използвана е роботизирана система, проследяваща множество параметри на модела, а за анализите им е приложено машинно обучение. Авторите са афилиирани към Универитета в Джорджия и малка биотехнологична компания, специализирана в тестване на репродуктивна токсичност. Публикацията на O'Brien et al (2006)[217] е тази с най-голям абсолютен брой вътрешни цитирания. Те описват валидирането на подход за класифициране на хепатотоксични субстанции чрез изследване на ефектите им върху *ин витро* модел (HepG2 клетъчна линия) чрез роботизирана система и автоматизиран многопараметричен анализ на получените данни. Проучването е проведено в Лабораториите по лекарствена безопасност на Prizer Global Research.

Ishii et al. (2022) анализират разпределението на канцероногенни антрахинони, включително метаболитите им, в различни бъбречни структури чрез масспектрометрични изображения. Авторите са афилиирани към Националния институт по науки за здравето в Япония.

Публикациите, свързани с кометния тест се нареждат в класацията едва след горепосочените публикации. Такива са публикациите на Azqueta et al (2011)[181] и Forchhammer et al

(2010)[180] и Frieauff et al (2001)[173], които бяха разгледани по-рано в труда.

Harrill et al. (2010)[218] описват автоматизирания анализ на морфометрия на неврити. Joshua Harrill към момента на публикуване е афилииран към NHEERL към EPA в САЩ. Verma et al. (2017)[219] пък въвеждат протокол за автоматизиране на теста за генотоксичност с микроядра. Афилиациите сочат към Департамента по природни науки на Университа на Суонзи, Великобритания.

Pointon et al. (2017)[220] валидират метод за високопроизводителни анализи на ефектите на различни вещества върху сърдечните съкращения в *ин витро* 3D клетъчен модел. Афилиирани са към отдел за неклинични изпитвания и безопасност в AstraZeneca R&D.

Wink et al. (2017)[221] описват употребата на съобщителни клетъчни линии (reporter cell line) като модел за идентифициране на клетъчния отговор към стресови стимули чрез експресия на зелен флуоресцентен протеин (green fluorescent protein, GFP). Авторите са афилиирани към Звеното по токсикология на Университета в Лайден, Нидерландия.

Посочените примери показват, че анализът на изображения е ключов компонент при автоматизиране и роботизиране на процеса на скрининг на тест съединения върху сложни *ин витро* моделни системи, а машинното обучение е предпочитан подход при анализа на получените многопараметрични данни. Други важни направления са масспекторметричните изображения, тестовете за генотоксичност и работата със съобщителни клетъчни линии.

Таблица 5. Списък с локално-цитирани публикации, броя локални цитирания, броя локални цитирания спрямо изминалите години от публикацията и ръчно означените след преглед на пълния текст идентификатори, съответстващи на класификацията , представена във Фигура 25. С жълт цвят е отбелязано наличие на идентификатор, че статията не включва компютърен анализ на изображения. Със син цвят е отбелязана статия, изтеглена заради некоректно добавени съавтори.

лок. цит.	цит. / год.	год.	първи автор	заглавие	списание	ID след преглед
4	1.3	2021	PISCHON H[212]	ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN TOXICOLOGIC PATHOLOGY: QUANTITATIVE EVALUATION OF COMPOUND-INDUCED HEPATOCELLULAR HYPERTROPHY IN RATS	TOXICOL PATHOL	8, 26, 49, 56, 73, 72, 151, 97, 114, 123, 110, 117, 136, 157, 159, 133, 140, 142
4	0.8	2019	GAUTHIER BE[210]	TOXICOLOGIC PATHOLOGY FORUM*: OPINION ON INTEGRATING INNOVATIVE DIGITAL PATHOLOGY TOOLS IN THE REGULATORY FRAMEWORK	TOXICOL PATHOL	8, 3, 11, 49, 72, 123, 125, 126, 143
2	0.7	2021	KUKLYTE J[211]	EVALUATION OF THE USE OF SINGLE- AND MULTI-MAGNIFICATION CONVOLUTIONAL NEURAL NETWORKS FOR THE DETERMINATION AND QUANTITATION OF LESIONS IN NONCLINICAL PATHOLOGY STUDIES	TOXICOL PATHOL	8, 49, 56, 73, 74, 78, 77, 79, 72, 102, 110, 123, 133, 140
2	0.7	2021	SCHUMACHER VL[213]	THE APPLICATION, CHALLENGES, AND ADVANCEMENT TOWARD REGULATORY ACCEPTANCE OF DIGITAL TOXICOLOGIC PATHOLOGY: RESULTS OF THE 7TH ESTP INTERNATIONAL EXPERT WORKSHOP (SEPTEMBER 20-21, 2019)	TOXICOL PATHOL	3, 8, 11, 49, 72, 123, 110, 141
3	0.5	2018	KOZLOWSKI C[222]	AN AUTOMATED IMAGE ANALYSIS METHOD TO QUANTIFY VETERINARY BONE MARROW CELLULARITY ON H\&E SECTIONS	TOXICOL PATHOL	8, 22, 23, 49, 56, 72, 75, 148, 114, 117, 134, 133, 155, 157, 159, 140, 142
2	0.5	2020	YIN L[216]	HIGH-CONTENT IMAGE-BASED SINGLE-CELL PHENOTYPIC ANALYSIS FOR THE TESTICULAR TOXICITY PREDICTION INDUCED BY BISPHENOL A AND ITS ANALOGS BISPHENOL S, BISPHENOL AF, AND TETRABROMOBISPHENOL A IN A THREE-DIMENSIONAL TESTICULAR CELL CO-CULTURE MODEL	TOXICOL SCI	31, 50, 57, 50, 71, 147, 104, 99, 157, 92, 118, 111, 110, 128, 129, 159, 158, 156, 157, 140, 142

1	0.5	2022	ISHII Y[223]	VISUALIZATION OF THE DISTRIBUTION OF ANTHRAQUINONE COMPONENTS FROM MADDER ROOTS IN RAT KIDNEYS BY DESORPTION ELECTROSPRAY IONIZATION-TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY IMAGING	FOOD CHEM TOXICOL	7, 15, 16, 49, 56, 72, 74, 159, 113, 114, 144, 133, 143
5	0.5	2013	LONG RE[150]	SCIENTIFIC AND REGULATORY POLICY COMMITTEE (SRPC) PAPER: VALIDATION OF DIGITAL PATHOLOGY SYSTEMS IN THE REGULATED NONCLINICAL ENVIRONMENT	TOXICOL PATHOL	8, 11, 49, 72, 123, 125, 126, 143
8	0.4	2006	O'BRIEN PJ[217]	HIGH CONCORDANCE OF DRUG-INDUCED HUMAN HEPATOTOXICITY WITH *ИН ВИТРО* CYTOTOXICITY MEASURED IN A NOVEL CELL-BASED MODEL USING HIGH CONTENT SCREENING	ARCH TOXICOL	8, 12, 83, 69, 50, 73, 98, 99, 157, 100, 94, 118, 111, 159, 156, 124, 140
3	0.4	2017	SARAVANAN C[214]	MEETING REPORT: TISSUE-BASED IMAGE ANALYSIS	TOXICOL PATHOL	8, 49, 56, 72, 123, 110, 133
2	0.4	2019	LINDAUER K[215]	DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN IMAGE ANALYSIS SYSTEM FOR THE MEASUREMENT OF CELL PROLIFERATION IN MAMMARY GLANDS OF RATS	TOXICOL PATHOL	8, 34, 81, 49, 56, 96, 147, 114, 139, 138, 140, 142
3	0.4	2016	ASAOKA Y[224]	HISTOPATHOLOGICAL IMAGE ANALYSIS OF CHEMICAL-INDUCED HEPATOCELLULAR HYPERTROPHY IN MICE	EXP TOXICOL PATHOL	2, 8, 26, 49, 57, 73, 72, 96, 151, 114, 133, 134, 140, 141
1	0.3	2021	RAMOT Y[225]	MICROSCOPE-BASED AUTOMATED QUANTIFICATION OF LIVER FIBROSIS IN MICE USING A DEEP LEARNING ALGORITHM	TOXICOL PATHOL	2, 8, 46, 49, 57, 73, 72, 102, 101, 110, 114, 131
1	0.3	2021	TOKARZ DA[226]	USING ARTIFICIAL INTELLIGENCE TO DETECT, CLASSIFY, AND OBJECTIVELY SCORE SEVERITY OF RODENT CARDIOMYOPATHY	TOXICOL PATHOL	2, 8, 11, 49, 56, 72, 79, 101, 102, 123, 110, 126
1	0.3	2021	ZURAW A[227]	DEVELOPING A QUALIFICATION AND VERIFICATION STRATEGY FOR DIGITAL TISSUE IMAGE ANALYSIS IN TOXICOLOGICAL PATHOLOGY	TOXICOL PATHOL	2, 11, 49, 72, 123, 110, 125
4	0.3	2011	AZQUETA A[181]	THE INFLUENCE OF SCORING METHOD ON VARIABILITY IN RESULTS OBTAINED WITH THE COMET ASSAY	MUTAGENESIS	2, 35, 24, 50, 50, 89, 69, 53, 106, 104, 118, 133, 140, 141
4	0.3	2010	FORCHHAMMER L[180]	VARIATION IN THE MEASUREMENT OF DNA DAMAGE BY COMET ASSAY MEASURED BY THE ECVAG INTER-LABORATORY VALIDATION TRIAL	MUTAGENESIS	2, 39, 88, 69, 50, 106, 118, 133, 141
4	0.3	2010	HARRILL JA[218]	QUANTITATIVE ASSESSMENT OF NEURITE OUTGROWTH IN HUMAN EMBRYONIC STEM CELL-DERIVED HN2â„¢ CELLS USING AUTOMATED HIGH-CONTENT IMAGE ANALYSIS	NEUROTOXICOLOGY	2, 44, 50, 53, 85, 108, 158, 118, 133, 141
2	0.3	2017	POINTON A[220]	HIGH-THROUGHPUT IMAGING OF CARDIAC MICROTISSUES FOR THE ASSESSMENT OF CARDIAC CONTRACTION DURING DRUG	TOXICOL SCI	8, 12, 50, 53, 71, 69, 109, 118, 121, 122, 133, 140

2	0.3	2017	VERMA JR[219]	EVALUATION OF THE AUTOMATED MICROFLOW AND METAFER PLATFORMS FOR HIGH-THROUGHPUT MICRONUCLEUS SCORING AND DOSE RESPONSE ANALYSIS IN HUMAN LYMPHOBLASTOID TK6 CELLS	ARCH TOXICOL	2, 8, 9, 5, 38, 50, 84, 69, 53, 107, 118, 114, 133
2	0.3	2017	WINK S[221]	HIGH-CONTENT IMAGING-BASED BAC-GFP TOXICITY PATHWAY REPORTERS TO ASSESS CHEMICAL ADVERSITY LIABILITIES	ARCH TOXICOL	2, 8, 12, 50, 73, 69, 83, 70, 94, 100, 104, 90, 157, 118, 122, 111, 128, 140, 142
6	0.3	2001	FRIEAUFF W[173]	AUTOMATIC ANALYSIS OF SLIDES PROCESSED IN THE COMET ASSAY	MUTAGENESIS	2, 38, 50, 57, 84, 69, 58, 106, 104, 118, 139, 133, 140, 142
1	0.3	2020	SRIVASTAVA A[228]	QUANTITATIVE NEUROTOXICOLOGY: AN ASSESSMENT OF THE NEUROTOXIC PROFILE OF KAINIC ACID IN SPRAGUE DAWLEY RATS	INT J TOXICOL	2, 44, 49, 56, 78, 72, 101, 102, 114, 123, 133, 140
1	0.3	2020	YOSHIKAWA T[229]	CURRENT STATUS OF PATHOLOGICAL IMAGE ANALYSIS TECHNOLOGY IN PHARMACEUTICAL COMPANIES: A QUESTIONNAIRE SURVEY OF THE JAPAN PHARMACEUTICAL MANUFACTURERS ASSOCIATION	J TOXICOL PATHOL	8, 49, 72, 123, 110, 141
4	0.2	2005	NOLTE T[230]	STANDARDIZED ASSESSMENT OF CELL PROLIFERATION:: THE APPROACH OF THE RITA *CEPA* WORKING GROUP	EXP TOXICOL PATHOL	2, 18, 49, 72, 96, 103, 114, 126, 143
1	0.2	2019	HORAI Y[231]	QUANTIFICATION OF HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS USING A NOVEL IMAGE ANALYSIS PLATFORM	J TOXICOL PATHOL	8, 11, 49, 73, 75, 74, 72, 153, 150, 147, 151, 157, 123, 117, 114, 110, 140, 133
1	0.2	2019	PETROFF R[232]	CHRONIC, LOW-LEVEL ORAL EXPOSURE TO MARINE TOXIN, DOMOIC ACID, ALTERS WHOLE BRAIN MORPHOMETRY IN NONHUMAN PRIMATES	NEUROTOXICOLOGY	5, 7, 44, 49, 55, 102, 120, 121, 122, 140
1	0.2	2019	RAMM S[233]	A SYSTEMS TOXICOLOGY APPROACH FOR THE PREDICTION OF KIDNEY TOXICITY AND ITS MECHANISMS *ИН ВИТРО*	TOXICOL SCI	8, 12, 50, 69, 74, 53, 94, 157, 99, 100, 111, 110, 133, 140
1	0.2	2019	TEIXIDO E[175]	AUTOMATED MORPHOLOGICAL FEATURE ASSESSMENT FOR ZEBRAFISH EMBRYO DEVELOPMENTAL TOXICITY SCREENS	TOXICOL SCI	8, 12, 49, 60, 62, 158, 153, 109, 157, 114, 110, 139, 138, 132
5	0.2	1994	FRIEAUFF W[199]	TECHNICAL ASPECTS OF AUTOMATIC MICRONUCLEUS ANALYSIS IN RODENT BONE-MARROW ASSAYS	CELL BIOL TOXICOL	2, 37, 49, 75, 57, 61, 107, 104, 114, 117, 133, 159, 157, 156, 140
1	0.2	2018	KOZLOWSKI C[234]	PROOF OF CONCEPT FOR AN AUTOMATED IMAGE ANALYSIS METHOD TO QUANTIFY RAT BONE MARROW HEMATOPOIETIC LINEAGES ON H\&E SECTIONS	TOXICOL PATHOL-a	8, 2, 22, 49, 56, 72, 75, 147, 114, 134, 133, 140, 142

1	0.2	2018	STOCK V[235]	A TRIPARTITE MODE OF ACTION APPROACH FOR INVESTIGATING THE IMPACT OF ANEUGENS ON TUBULIN POLYMERIZATION	ENVIRON MOL MUTAGEN	8, 2, 38, 50, 58, 77, 86, 150, 104, 154, 118, 133, 140
1	0.2	2018	WINK S[236]	DYNAMIC IMAGING OF ADAPTIVE STRESS RESPONSE PATHWAY ACTIVATION FOR PREDICTION OF DRUG INDUCED LIVER INJURY	ARCH TOXICOL	8, 12, 50, 83, 69, 53, 73, 157, 147, 98, 148, 90, 94, 118, 110, 111, 128, 140, 142, 130, 132
2	0.1	2010	MUNDY WR[237]	NEURONAL MODELS FOR EVALUATION OF PROLIFERATION *ИН ВИТРО* USING HIGH CONTENT SCREENING	TOXICOLOGY	2, 8, 45, 33, 22, 38, 24, 41, 50, 85, 96, 147, 118, 133
1	0.1	2017	LAZZARI M[238]	DIFFERENTIAL RESPONSE OF OLFACTORY SENSORY NEURON POPULATIONS TO COPPER ION EXPOSURE IN ZEBRAFISH	AQUAT TOXICOL	5, 41, 49, 60, 62, 85, 72, 147, 154, 114, 130
2	0.1	2009	ZHU YJ[239]	MOLECULAR AND TOXICOLOGIC RESEARCH IN NEWBORN HYPOSPADIAC MALE RATS FOLLOWING IN UTERO EXPOSURE TO DI-N-BUTYL PHTHALATE (DBP)	TOXICOLOGY	32, 49, 56, 145
1	0.1	2016	BIGLEY AL[240]	USING AUTOMATED IMAGE ANALYSIS ALGORITHMS TO DISTINGUISH NORMAL, ABERRANT, AND DEGENERATE MITOTIC FIGURES INDUCED BY EG5 INHIBITION	TOXICOL PATHOL	8, 22, 49, 69, 56, 72, 147, 157, 158, 96, 133
1	0.1	2016	DEAL S[241]	DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF TOXICANT-TREATED ZEBRAFISH LARVAE USING BRIGHTFIELD IMAGING AND HIGH-CONTENT ANALYSIS	J APPL TOXICOL	2, 8, 5, 12, 49, 62, 60, 153, 152, 158, 114, 111, 110, 133
1	0.1	2016	GARMAN RH[242]	RECOMMENDED METHODS FOR BRAIN PROCESSING AND QUANTITATIVE ANALYSIS IN RODENT DEVELOPMENTAL NEUROTOXICITY STUDIES	TOXICOL PATHOL	2, 8, 5, 3, 44, 49, 56, 78, 72, 114, 123, 126, 130
2	0.1	2004	DAS KP[174]	ASSESSMENT OF PC12 CELL DIFFERENTIATION AND NEURITC GROWTH: A COMPARISON OF MORPHOLOGICAL AND NEUROCHEMICAL MEASURES	NEUROTOXICOL TERATOL	2, 19, 50, 56, 85, 108, 115, 127
1	0.1	2014	BERNARDI M[243]	ABSENCE OF MICRONUCLEUS FORMATION IN CHO-K1 CELLS CULTIVATED IN PLATELET LYSATE ENRICHED MEDIUM	EXP TOXICOL PATHOL	2, 38, 58, 69, 50, 107, 118, 133, 140, 141
1	0.1	2014	HAMMAD S[244]	PROTOCOLS FOR STAINING OF BILE CANALICULAR AND SINUSOIDAL NETWORKS OF HUMAN, MOUSE AND PIG LIVERS, THREE-DIMENSIONAL RECONSTRUCTION AND QUANTIFICATION OF TISSUE MICROARCHITECTURE BY IMAGE PROCESSING AND ANALYSIS	ARCH TOXICOL	2, 49, 73, 72, 146, 118, 121, 137
1	0.1	2014	MACHADO MD[245]	MODIFICATION OF CELL VOLUME AND PROLIFERATIVE CAPACITY OF *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA* CELLS EXPOSED TO METAL STRESS	AQUAT TOXICOL	5, 41, 67, 158, 152, 114, 118, 133, 141
1	0.1	2014	NAKANISHI T[246]	QUANTITATIVE MASS BARCODE-LIKE IMAGE OF NICOTINE IN SINGLE LONGITUDINALLY SLICED HAIR SECTIONS FROM LONG-TERM SMOKERS BY MATRIX-ASSISTED LASER	J ANAL TOXICOL	4, 27, 50, 80, 159, 113, 126, 145

				DESORPTION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY IMAGING		
2	0.1	2002	AXELRAD JC[247]	INTERACTIONS BETWEEN PESTICIDES AND COMPONENTS OF PESTICIDE FORMULATIONS IN AN *ИН ВИТРО* NEUROTOXICITY TEST	TOXICOL OGY	7, 9, 40, 50, 57, 85, 69, 108, 114, 133, 143
2	0.1	2002	KISKINIS E[248]	HIGH THROUGHPUT COMET ASSAY USING 96-WELL PLATES	MUTAGE NESIS	2, 38, 50, 57, 84, 69, 106, 104, 111, 133, 139
2	0.1	2002	RIECKE K[249]	LOW DOSES OF 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-<I>P</I>-DIOXIN INCREASE TRANSFORMING GROWTH FACTOR Î’ AND CAUSE MYOCARDIAL FIBROSIS IN MARMOSETS (*CALLITHRIX JACCHUS*)	ARCH TOXICOL	9, 5, 20, 49, 54, 79, 72, 102, 114, 133, 140
1	0.1	2013	AUNG KH[250]	INHIBITION OF NEURITE OUTGROWTH AND ALTERATION OF CYTOSKELETAL GENE EXPRESSION BY SODIUM ARSENITE	NEUROTO XICOLOG Y	5, 7, 41, 50, 57, 69, 85, 108, 118, 133
1	0.1	2013	FRIEAUFF W[251]	AUTOMATIC ANALYSIS OF THE MICRONUCLEUS TEST IN PRIMARY HUMAN LYMPHOCYTES USING IMAGE ANALYSIS	MUTAGE NESIS	2, 9, 8, 12, 38, 50, 53, 89, 76, 50, 107, 104, 114, 111, 133, 140
1	0.1	2013	HALL AP[252]	COMPARISON OF COMPUTERIZED IMAGE ANALYSIS WITH TRADITIONAL SEMIQUANTITATIVE SCORING OF PERLS' PRUSSIAN BLUE STAINED HEPATIC IRON DEPOSITION	TOXICOL PATHOL	2, 8, 11, 49, 56, 73, 72, 102, 101, 110, 114, 117, 126, 140, 141
1	0.1	2013	MERCER RR[253]	DISTRIBUTION AND FIBROTIC RESPONSE FOLLOWING INHALATION EXPOSURE TO MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES	PART FIBRE TOXICOL	5, 9, 48, 49, 57, 77, 72, 159, 116, 145
1	0.1	2013	WAKUI S[254,255]	NUCLEAR MORPHOMETRIC ANALYSIS OF LEYDIG CELLS OF MALE PUBERTAL RATS EXPOSED *IN UTERO* TO DI(*N*-BUTYL) PHTHALATE	J TOXICOL PATHOL	32, 49, 56, 72, 158, 92, 104, 114, 139
2	0.1	2001	JOHNSON I[256]	AN ASSESSMENT OF THE FEASIBILITY OF USING IMAGE ANALYSIS IN THE OYSTER EMBRYO-LARVAL DEVELOPMENT TEST	ENVIRON TOXICOL	5, 41, 49, 63, 152, 153, 149, 114, 133
1	0.1	2012	BEASLEY A[257]	CONSISTENCY OF MORPHOLOGICAL ENDPOINTS USED TO ASSESS DEVELOPMENTAL TIMING IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) ACROSS A TEMPERATURE GRADIENT	REPROD TOXICOL	5, 47, 60, 62, 49, 157, 158, 110, 114, 133
1	0.1	2012	FOIT K[258]	AUTOMATED NANOCOSM TEST SYSTEM TO ASSESS THE EFFECTS OF STRESSORS ON TWO INTERACTING POPULATIONS	AQUAT TOXICOL-a	5, 14, 65, 51, 49, 158, 159, 149, 130, 140, 142
1	0.1	2012	SINGH RP[259]	CELLULAR UPTAKE, INTRACELLULAR TRAFFICKING AND CYTOTOXICITY OF SILVER NANOPARTICLES	TOXICOL LETT	10, 47, 50, 69, 73, 83, 74, 77, 159, 118, 130, 140
1	0.1	2012	SWEDIN L[260]	PULMONARY EXPOSURE TO SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES DOES NOT AFFECT THE EARLY IMMUNE RESPONSE AGAINST *TOXOPLASMA GONDII*	PART FIBRE TOXICOL	9, 48, 49, 57, 77, 72, 159, 119, 133, 159, 156, 141

2	0.1	1999	L'AZOU B[261]	*ИН ВИТРО* MODELS TO STUDY MECHANISMS INVOLVED IN CYCLOSPORINE A-MEDIATED GLOMERULAR CONTRACTION	ARCH TOXICOL	8, 45, 56, 50, 74, 70, 152, 115, 133, 140
1	0.1	2011	BOLON B[262]	CONTINUING EDUCATION COURSE \#3: CURRENT PRACTICES AND FUTURE TRENDS IN NEUROPATHOLOGY ASSESSMENT FOR DEVELOPMENTAL NEUROTOXICITY TESTING	TOXICOL PATHOL	11, 49, 72, 114, 145
1	0.1	2011	DUNSTAN RW[263]	THE USE OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY FOR BIOMARKER ASSESSMENT-CAN IT COMPETE WITH OTHER TECHNOLOGIES?	TOXICOL PATHOL	2, 8, 5, 7, 11, 49, 72, 114, 133, 126, 143
1	0.1	2011	JIANG JT[264]	PRENATAL EXPOSURE TO DI-N-BUTYL PHTHALATE INDUCES ANORECTAL MALFORMATIONS IN MALE RAT OFFSPRING	TOXICOL OGY	2, 32, 49, 56, 93, 114, 145
1	0.1	2011	MIKI A[265]	IMAGING OF METHAMPHETAMINE INCORPORATED INTO HAIR BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY	FORENSIC TOXICOL	6, 4, 29, 53, 80, 154, 113, 133, 143
1	0.1	2011	ZHANG Q[266]	UPTAKE OF GOLD NANOPARTICLES IN MURINE MACROPHAGE CELLS WITHOUT CYTOTOXICITY OR PRODUCTION OF PRO-INFLAMMATORY MEDIATORS	NANOTO XICOLOG Y	8, 47, 50, 87, 159, 99, 112, 145
1	0.1	2009	MCGEE MR[267]	PREDATOR AVOIDANCE PERFORMANCE OF LARVAL FATHEAD MINNOWS (*PIMEPHALES PROMELAS*) FOLLOWING SHORT-TERM EXPOSURE TO ESTROGEN MIXTURES	AQUAT TOXICOL	5, 33, 49, 60, 109, 109, 122, 139, 141
1	0.1	2008	CALAS AG[268]	CHRONIC EXPOSURE TO GLUFOSINATE-AMMONIUM INDUCES SPATIAL MEMORY IMPAIRMENTS, HIPPOCAMPAL MRI MODIFICATIONS AND GLUTAMINE SYNTHETASE ACTIVATION IN MICE	NEUROTO XICOLOG Y	6, 27, 49, 56, 78, 72, 102, 145
1	0.1	2008	MUNDY WR[269]	PROTEIN BIOMARKERS ASSOCIATED WITH GROWTH AND SYNAPTOGENESIS IN A CELL CULTURE MODEL OF NEURONAL DEVELOPMENT	TOXICOL OGY	2, 44, 50, 56, 70, 108, 118, 133, 141
1	0.1	2008	PEJCHAL J[270]	ACTIVATION OF MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK) PATHWAYS AFTER SOMAN POISONING IN RAT CEREBELLAR GRANULE NEURONS	J APPL TOXICOL	9, 40, 49, 56, 72, 78, 94, 114, 133, 141
1	0.1	2006	GUERLET E[271]	FIELD APPLICATION OF A SET OF CELLULAR BIOMARKERS IN THE DIGESTIVE GLAND OF THE FRESHWATER SNAIL *RADIX PEREGRA* (GASTROPODA, PULMONATA)	AQUAT TOXICOL	5, 13, 49, 64, 72, 152, 153, 114, 133, 140
1	0.1	2005	ALVARADO NE[272]	CELLULAR BIOMARKERS OF EXPOSURE AND BIOLOGICAL EFFECT IN HEPATOCYTES OF TURBOT (*SCOPHTHALMUS MAXIMUS*) EXPOSED TO CD, CU AND ZN AND AFTER DEPURATION	AQUAT TOXICOL	5, 41, 49, 60, 73, 72, 153, 158, 114, 133, 140, 141
1	0.1	2005	DHAR P[273]	PRELIMINARY MORPHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL CHANGES IN RAT SPINAL CORD NEURONS FOLLOWING ARSENIC INGESTION	NEUROTO XICOLOG Y	2, 5, 7, 8, 41, 49, 56, 85, 72, 153, 114, 133, 140
1	0.1	2005	MITIC T[274]	IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF ACETYLATION, PROLIFERATION, MITOSIS, AND APOPTOSIS IN TUMOR XENOGRAFTS FOLLOWING ADMINISTRATION OF A HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR - A PILOT STUDY	TOXICOL PATHOL	8, 25, 49, 57, 69, 72, 153, 154, 96, 114, 133, 143

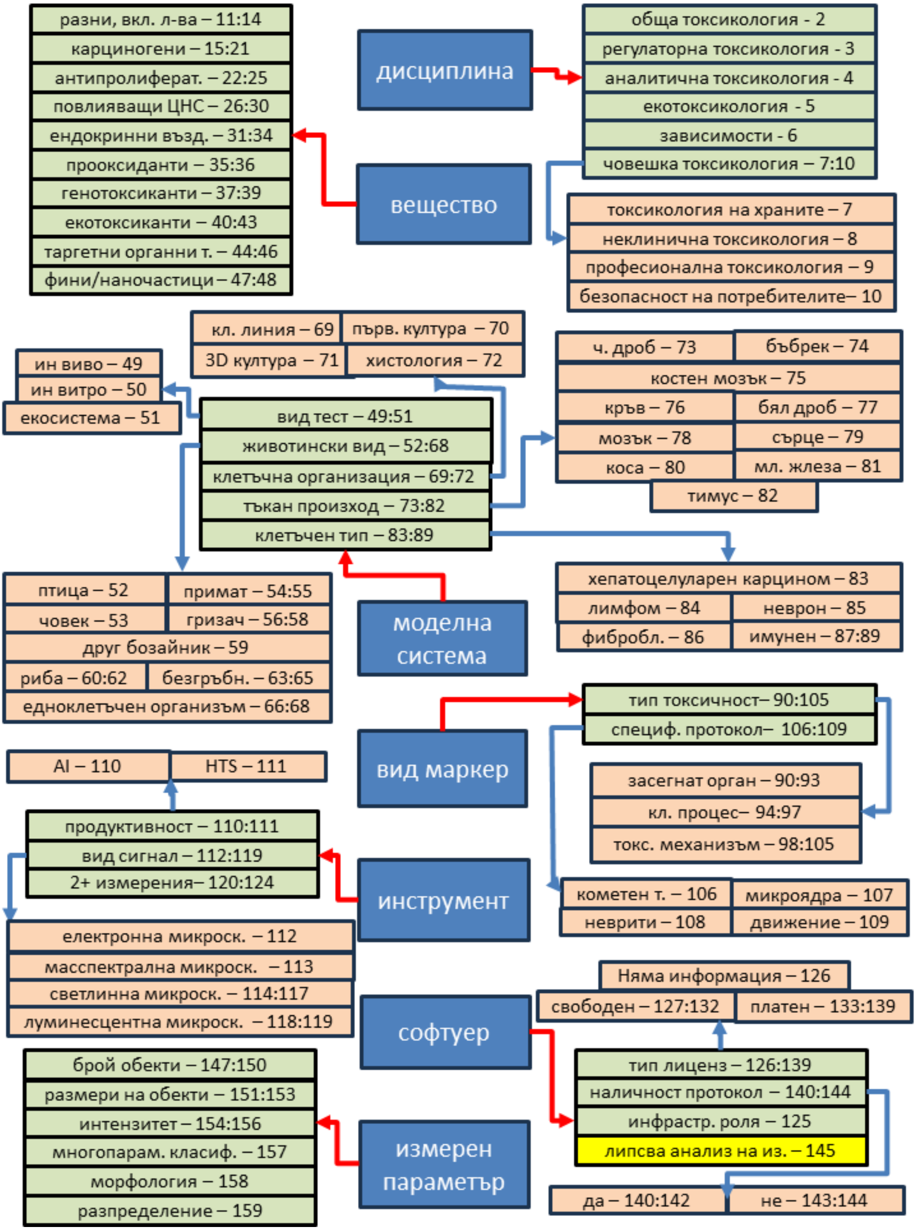
1	0.1	2005	OBEREMM A[275]	DIFFERENTIAL SIGNATURES OF PROTEIN EXPRESSION IN MARMOSET LIVER AND THYMUS INDUCED BY SINGLE-DOSE TCDD TREATMENT	TOXICOL OGY	5, 20, 49, 54, 73, 82, 154, 153, 113, 133, 143
1	0.1	2004	COLTON HM[276]	VISUALIZATION AND QUANTITATION OF PEROXISOMES USING FLUORESCENT NANOCRYSTALS: TREATMENT OF RATS AND MONKEYS WITH FIBRATES AND DETECTION IN THE LIVER	TOXICOL SCI	8, 12, 49, 56, 55, 73, 72, 153, 150, 118, 133, 140, 141
1	0.1	2004	GARCIA G[277]	STUDY OF TYROSINE HYDROXYLASE IMMUNOREACTIVE NEURONS IN NEONATE RATS LACTATIONALLY EXPOSED TO 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID	NEUROTO XICOLOG Y	2, 8, 5, 40, 49, 56, 78, 85, 72, 154, 114, 133
1	0	2003	DUEZ P[278]	STATISTICS OF THE COMET ASSAY: A KEY TO DISCRIMINATE BETWEEN GENOTOXIC EFFECTS	MUTAGE NESIS	2, 35, 50, 57, 84, 69, 106, 104, 118, 135, 133, 143
1	0	2001	CHENG SH[279]	THE USE OF MICROANGIOGRAPHY IN DETECTING ABERRANT VASCULATURE IN ZEBRAFISH EMBRYOS EXPOSED TO CADMIUM	AQUAT TOXICOL	5, 41, 49, 60, 62, 158, 118, 133, 140
1	0	2001	TAHEDL H[280]	AUTOMATED BIOMONITORING USING REAL TIME MOVEMENT ANALYSIS OF *EUGLENA GRACILIS*	ECOTOX ENVIRON SAFE	5, 13, 66, 109, 114, 122, 139, 140, 142
1	0	2000	WINZER K[281]	SHORT-TIME INDUCTION OF OXIDATIVE STRESS IN HEPATOCYTES OF THE EUROPEAN FLOUNDER (*PLATICHTHYS FLESUS*)	MAR ENVIRON RES	2, 5, 35, 60, 61, 73, 70, 50, 100, 145
1	0	1999	ANTONINI JM[282]	APPLICATION OF LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPY IN THE ANALYSIS OF PARTICLE-INDUCED PULMONARY FIBROSIS	TOXICOL SCI	2, 8, 48, 49, 56, 77, 72, 153, 154, 118, 121, 133
1	0	1999	BARROUILLET MP[283]	PROTECTIVE EFFECTS OF POLYPHENOLS AGAINST CADMIUM-INDUCED GLOMERULAR MESANGIAL CELL MYOCONTRACTURE	ARCH TOXICOL	2, 41, 50, 50, 56, 74, 152, 153, 114, 133, 143
1	0	1999	ORRIS AS[284]	ISOTRETINOIN ALTERS MORPHOLOGY, POLARITY, AND MOTILITY OF NEURAL CREST CELLS IN CULTURE	REPROD TOXICOL	33, 50, 50, 70, 85, 52, 109, 158, 96, 114, 122, 139, 140, 141
1	0	1998	KOHLER A[285]	INITIAL VELOCITIES IN SITU OF G6PDH AND PGDH AND EXPRESSION OF PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA): SENSITIVE DIAGNOSTIC MARKERS OF ENVIRONMENTALLY INDUCED HEPATOCELLULAR CARCINOGENESIS IN A MARINE FLATFISH (PLATICHTHYS FLESUS L)	AQUAT TOXICOL	5, 13, 60, 61, 49, 72, 73, 103, 114, 117, 159, 156, 127, 133, 140, 141
1	0	1997	MCDONAL DTAYLOR CK[286]	URANYL NITRATE-INDUCED PROXIMAL TUBULE ALTERATIONS IN RABBITS: A QUANTITATIVE ANALYSIS	TOXICOL PATHOL	9, 7, 5, 41, 49, 72, 74, 59, 153, 150, 114, 112, 133, 140
1	0	1997	WU CH[287]	MEMBRANE TOXICITY OF OPIOIDS MEASURED BY PROTOZOAN MOTILITY	TOXICOL OGY	5, 8, 2, 28, 68, 49, 50, 109, 99, 122, 133, 141, 140
1	0	1995	ANDERSON D[288]	AN INVESTIGATION OF THE DNA-DAMAGING ABILITY OF BENZENE AND ITS METABOLITES IN HUMAN LYMPHOCYTES, USING THE COMET ASSAY	ENVIRON MOL MUTAGE N	9, 17, 53, 76, 50, 50, 106, 104, 118, 135, 133, 143

1	0	1993	HARKEMA JR[289]	OZONE-INDUCED AND ENDOTOXIN-INDUCED MUCOUS CELL METAPLASIAS IN RAT AIRWAY EPITHELIUM - NOVEL ANIMAL-MODELS TO STUDY TOXICANT-INDUCED EPITHELIAL TRANSFORMATION IN AIRWAYS	TOXICOL LETT	2, 5, 35, 49, 56, 77, 72, 96, 114, 133, 143
1	0	1991	LUTHMAN J[290]	COMBINED LEAD ACETATE AND DISULFIRAM TREATMENT-INDUCED ALTERATIONS OF GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN (GFA) IMMUNOREACTIVE ASTROCYTES IN BRAIN SMEARS	TOXICOL OGY	9, 5, 41, 21, 49, 56, 78, 72, 158, 151, 118, 133, 140

Класификация

Онтологията, която да послужи за последващите анализи на пълни текстове, е структурирана по такъв начин, че приложението на съдържащите се класификации към всяка една статия да подпомогне разбирането на типа научен проблем, вида експериментална моделна система и приложения аналитичен инструментариум (Фигура 25).

Адресираните научни проблеми могат да бъдат описани с помощта на класификацията за типа „ВЕЩЕСТВО“, което е обект на тестване или за спектъра от вещества, които биха могли да бъдат тествани чрез съответната методология. Едно и също вещество може да бъде прилагано за различни цели в различен контекст (например тежки метали, органофосфати). За да бъде недвусмислено изяснено какъв вид е потенциалната вредност на изследваните веществата, е приложена и класификацията за токсикологична „ДИСЦИПЛИНА. По този начин бива пояснено от чия перспектива е разглеждан въпроса за потенциална токсичност. Записите от WoS също съдържат информация за дисциплината, но „ръчно“ проверената класификация е за предпочитане, защото е по-детайлна и подчинена на целите на настоящия анализ.



Фигура 25. Критерии за класификация на локално-цитираните статии, идентифициране след предварителен, бърз преглед.

Критериите са обозначени в сини правоъгълници, основните класове – в зелени и съответните подкласове – в зелен. С жълт цвят е обозначен единственият клас, обозначаващ липса на анализ на изображения. С цифри са зададени идентификатори за всеки клас и подклас.

Биологичният въпрос диктува подбора на инструментариум за изследването му. Този инструментариум, включително анализите на изображения, трябва да функционира в синхрон, за да произведе адекватни научни отговори. Това води към взаимосвързана група от понятия и съответните класификационни системи за „МОДЕЛНА СИСТЕМА“, „ТИП МАРКЕР“, „ИНСТРУМЕНТ“ и вид „ИЗМЕРЕН ПАРАМЕТЪР“.

Разгледани са някои основни характеристики на вида софтуер като това дали е със свободен достъп и в каква степен публикацията предоставя достатъчна информация за софтуера и протокола, но не са разгледани конкретни софтуерни продукти, които са обект на други раздели от труда.

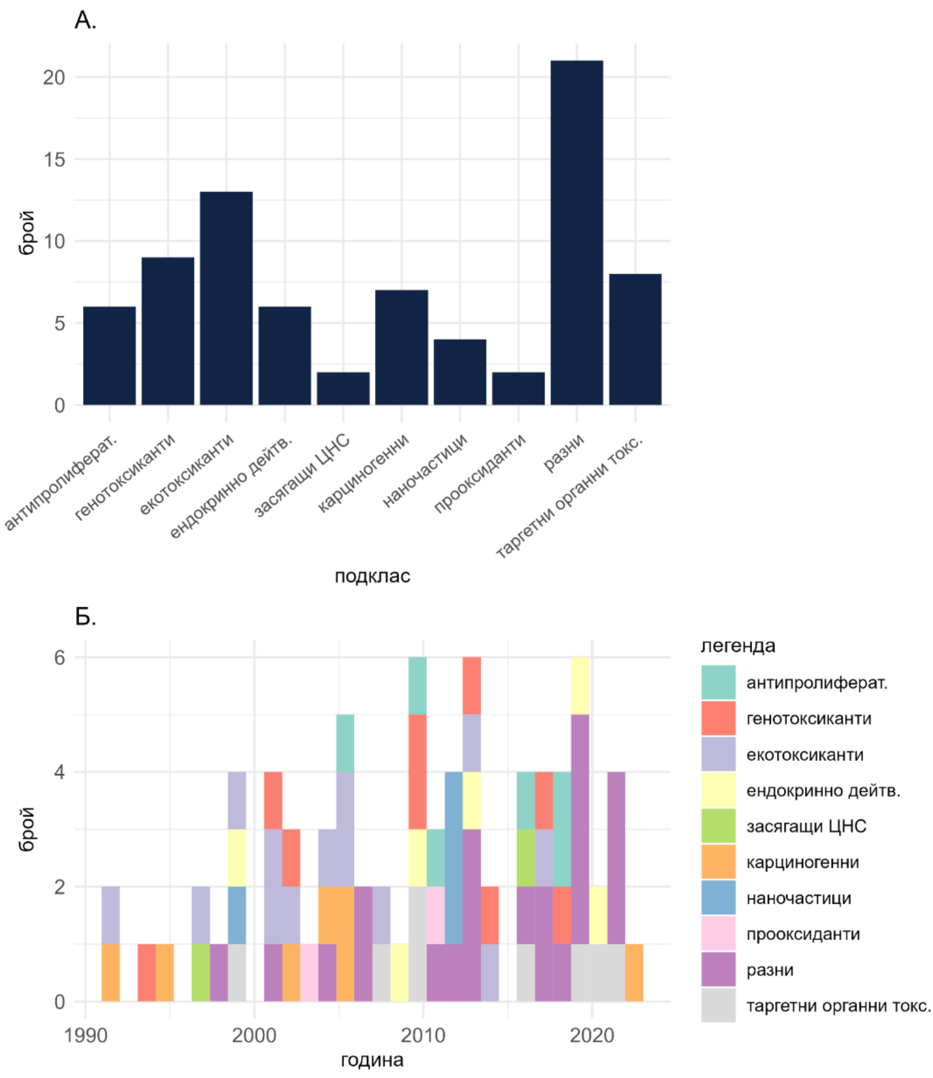
Тип вещество

Групирането на водещите публикации спрямо вида изследвани вещества показва в кои сфери на бита имат най-голям принос токсикологичните анализи на изображения. Преобладаващи по този показател са публикациите, които не поставят ограничения относно типа изследвано вещество („разни“, Фигура 26). Тази неопределеност се дължи на факта, че в тези публикации са описани принципите на методики, приложими към всякакви субстанции. Такива са публикациите, описващи принципите за ефективно приложение на дигиталната патология[210,252] и публикациите, описващи подходите за класифициране на разнородни системни изменения чрез многопараметрични анализи[221,226,227]. Изображенията са подходящ източник на данни за такива анализи. Наблюдава се изместване на парадигмата от

токсикологични тестове, измерващи конкретен маркер за предефинирана хипотеза към такива, изследващи множество маркери с цел генериране и едновременно с това тестване на нови хипотези[291]. Изображенията са вид данни, които не само че е вероятно да устоят на тази промяна, но и значението следва да нарастне, защото могат да включат неограничен брой измерения. Прави впечатление, че значимите публикации, фокусирани върху субстанции от типа „разни“ са все по-често срещани с течение на времето, като повече от половината от тях са от последните 5 години (Фигура 26 Б.).

На второ място по значение са публикациите, изследващи екотоксиканти. Мнозинството описват ефектите на различни вещества върху водни организми[238,256,272,279]. Особено внимание е обърнато на тежки метали[283,286,290] и пестициди[247,277]. Част от селектираните изследвания на екотоксиканти прилагат някои нетипични методи и модели, като теста за охарактеризиране на разпределението и движението на съвместно отглеждани популации от два вида водни членестоноги[258]. С течение на времето, ролята изследванията върху екотоксиканти се запазва, макар че пикът е между 2001 и 2005 г., а след 2017 г. не се наблюдават подобни публикации с вътрешни цитирания (Фигура 26 Б.).

Следващи по значение по низходящ ред на фракциите са изследванията на генотоксиканти, таргетни органни токсиканти, карциногени, антипролиферативни и вещества повлияващи ендокринната система (Фигура 26 Б.). Изглежда при всички тези вещества се забеляза появата на публикации равномерно в течение на времето, като измежду тях са най-актуални тестовете за таргетни органни токсиканти. Сред въпросните публикации преобладават тези, описващи дигитална патология, AI



Фигура 26. *Вид изследвани вещества, за които се съобщава в статиите с вътрешни цитирания по темата. Количествено разпределение за целия период (А.) и по години (Б.).*

приложения и тези, изследващи невротоксични прояви[228,232]. Анализите на изображения имат актуална роля и за вещества с ендокринни ефекти и карциногени. Изследваните през последните пет години ендокринни ефекти са свързани с репродуктивна токсичност[216] и ефекти върху пролиферация на клетките в млечните жлези[215]. Последната публикация за карциногени описва разпределението на антрахинони от растителна дрога и техни метаболити в различни бъбречни структури, определено чрез масспектрометрично заснемане[223].

Следващи по големини на фракциите са наночастиците, прооксидантите и веществата, повлияващи централна нервна система (ЦНС). При изследванията на наночастици, първата вътрешно цитирана публикация е от 1999 г. Тя описва анализ на

фибротични изменения в бял дроб на плъхове след инхалация на силно фиброгенни силикатни частици или нефиброгенни частици от Fe_2O_3 чрез конфокална микроскопия[282]. Всички останали публикации, съобщаващи за наночастици, са групирани в периода около 2012 г., като отново разглеждат предимно *ин виво* инхалаторна експозиция[253,260] на нанотръби или *ин витро* разпределението на метални частици и поемането им от клетките[259,266]. Прооксидантите са разглеждани от гледната точка на генотоксично действие, измерено чрез кометния тест[181,278], чернодробно увреждане в риби[281] или *ин виво* моделиране на белодробно увреждане[289]. При ЦНС повлияващите вещества преобладават публикации, акцентиращи на масспектрометричния анализ на разпределението на забранени и контролирани субстанции в косми[246,265].

Дисциплини и цели

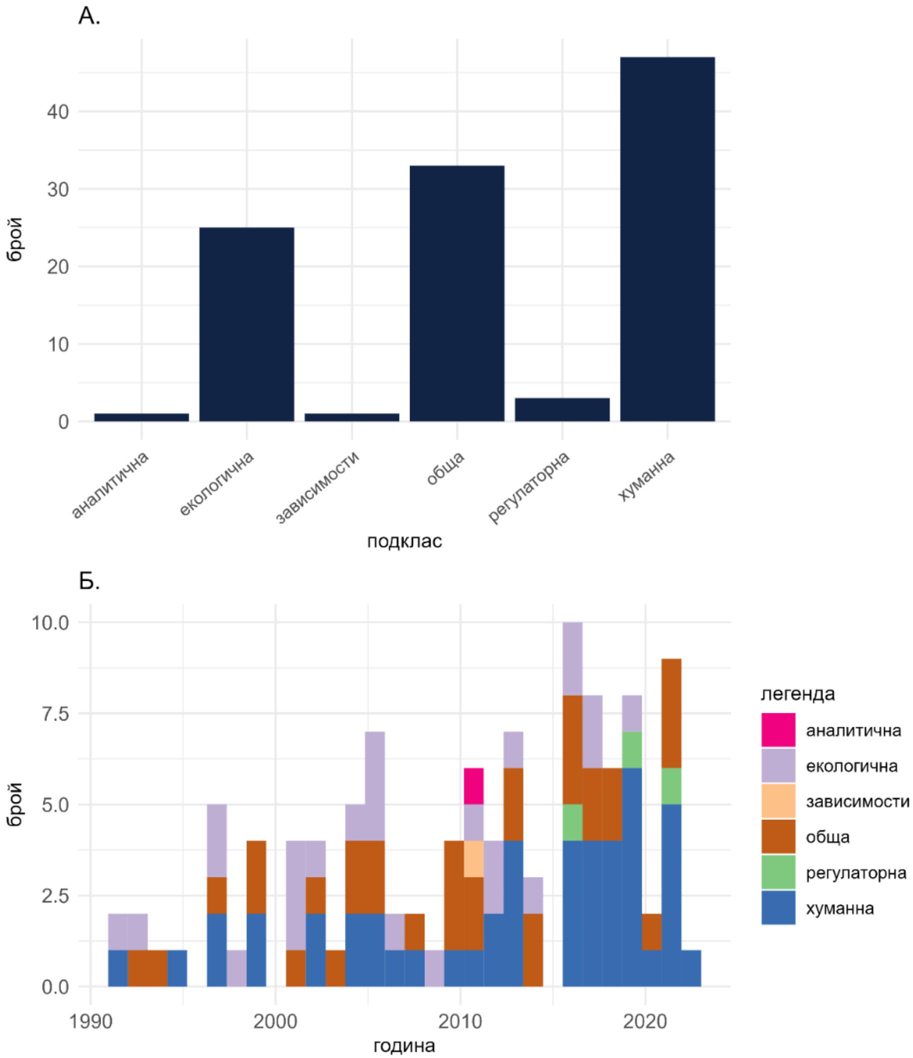
Класификацията по токсикологични дисциплини е логически свързана с гореописаната класификация за вида изследвано вещество и е очаквано двете класификации да разкриват сходни

тенденции. В сравнение с предходно описаната, класификацията по дисциплини позволява разширен поглед върху конкретните цели, поставени при изследване на съответните вещества.

Разпределението показва, че сред публикациите преобладават тези, целящи да предвидят ефектите на токсикантите върху човешкия организъм („хуманна“, Фигура 27). Наблюдаваната тенденция е значението на тези публикации да се увеличава. Повече от половината от тях са от последното десетилетие. За да определим в кои сфери на бита са преобладаващите изследвания, свързани с тази група, тя е разбита на подкласове и разгледана в повече детайли в следващата точка.

На второ място по значение е общата или фундаментална токсикология (Фигура 27). Тя изучава механизми на увреждане, които са общи за различни биологични видове. Веществата, описани във въпросните публикации имат конкретен източник, вид, приложение и са тествани върху определен модел. Въпреки това, направените изводи показват по-общи принципи и механизми, приложими за общи биохимични принципи. Публикацията на Srivastava et al. (2020)[228], например, разглежда ефектите на каинат върху различни типове неврони в ЦНС. Каинатни глутаматергични рецептори се откриват в организми с различно ниво на организация: гръбначни[292], насекоми[293], бодлокожи[294].

Друг пример е идентифицирането на вещества, предизвикващи хепатоцелуларна хипертрофия или пролиферация[221,244,252]. Тя би могла да е проблем както за потенциални лекарства и лекарство-доставящи системи, така и по отношение на вещества в храни, потребителски продукти, животни в естествената им среда[281] и други.



Фигура 27. Токсикологично направление на статиите с вътрешни цитирания по темата. Количествено разпределение за целия период (А.) и по години (Б.).

На трето място по, значение е групата публикации в сферата на екотоксикологията (Фигура 27). Тенденциите съвпадат с тези при публикациите, изследващи екотоксиканти (Фигура 26).

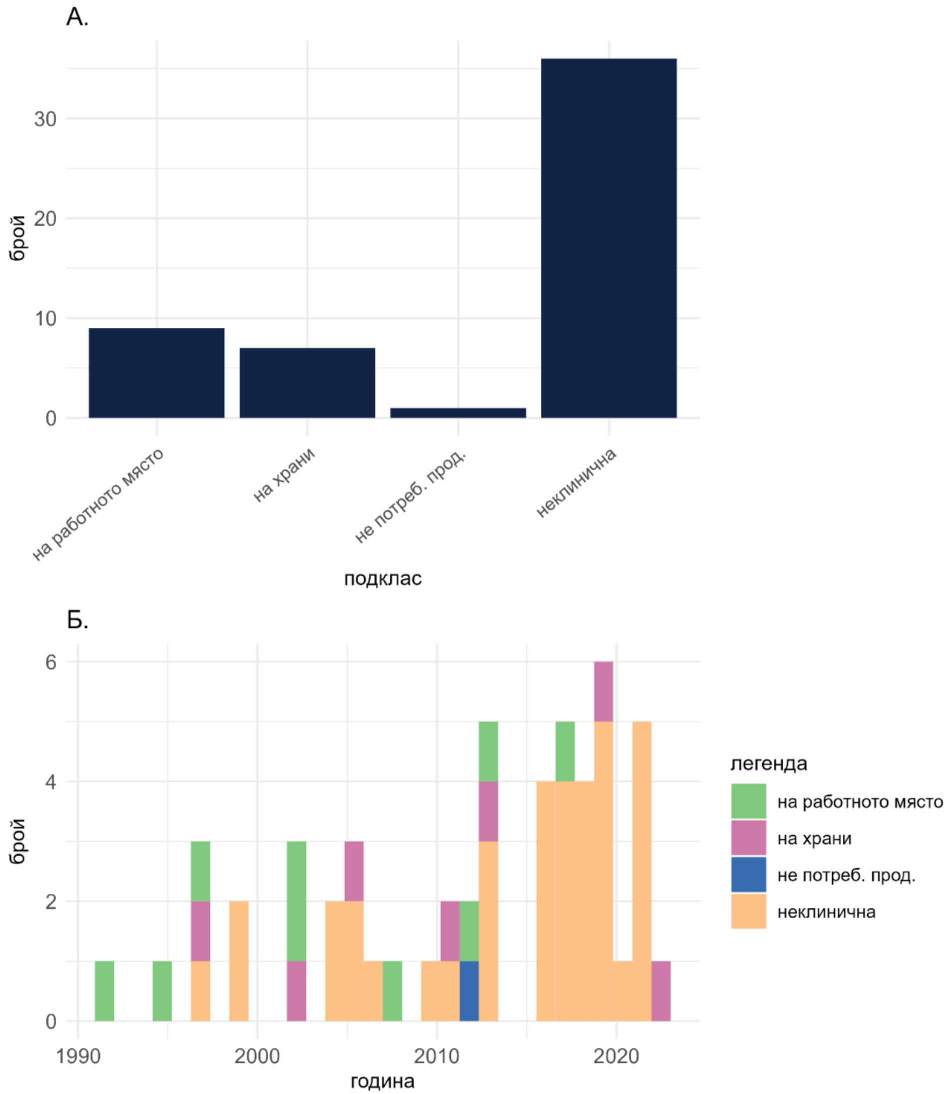
Анализите на изображения имат известен принос и към теми като зависимости, психоактивни вещества, аналитична токсикология и регулаторна токсикология. Публикацията в сферата на зависимостите съвпада със споменатата в предходната точка, описваща масспектрометричния анализ в косми[265]. Статиите, засягащи регулаторни теми са от последното десетилетие и имат отношение към усилията за регламентиране на приложенията на дигиталната патология[242,210,213].

Сфери на човешкия бит

Публикациите, принадлежаща към класа „хуманна“ токсикология (Фигура 27) могат да бъдат разделени на подкласове, за да бъде разгледана в по-голяма конкретика приложимостта към конкретната сфера в човешкия бит (Фигура 28).

Най-големият подклас включва публикации, засягащи неклиничните токсикологични тестове. Повечето от половината от тези публикации са от последното десетилетие, като през същия период, почти всички значими публикации са с неклинична насоченост. Те описват охарактеризирането на ефектите на различни вещества чрез приложение на *ин витро* и *ин виво* модели. Сред тях преобладават такива, определящи невротоксични ефекти[242,269,273,277], хепатотоксичност[224,225], генотоксичност[219,251] и кардиотоксичност[226].

Причината методите за анализ на изображения да имат най-голям отзвук в сферата на неклиничните анализи на изображения би могла да се търси в дефицитът на достатъчна



Фигура 28. Практическа сфера на адресиращите човешкото здраве публикации по темата. Количествено разпределение за целия период (А.) и по години (Б.).

прогнозна стойност на неклиничните тестове по отношение на някои токсични прояви. В резултат на ниската прогнозна стойност има случаи на изтеглени от пазара вещества заради тежки нежелани реакции[295]. Ограниченията на рутинно прилаганите методи изискват да се оптимизират съществуващите и да се въведат нови подходи, генериращи богати на информация резултати, които чрез подходящ анализ да позволят идентифицирането по-широк спектър от маргинални отклонения. Потенциален проблем при това е свързан с увеличаване на грешките от тип I, или откриване на токсично увреждане там, където то липсва (фалшиво положителен резултат), което би могло да доведе до преустановяване на разработката на лекарства с голяма полза поради малки рискове. За да се избегне такъв резултат, е необходимо обстойно валидиране на методите за анализ на данните, извлечени от изображенията.

На второ място по значение са публикациите, при които анализите на изображения служат на целта охарактеризиране токсичните рискове по време на трудовия процес. Въпросните публикации засягат изследвания на ефектите на експозиция с тежки метали[286,290], фини прахови частици[253,260], органични разтворители[288], пестициди[247] и други[249].

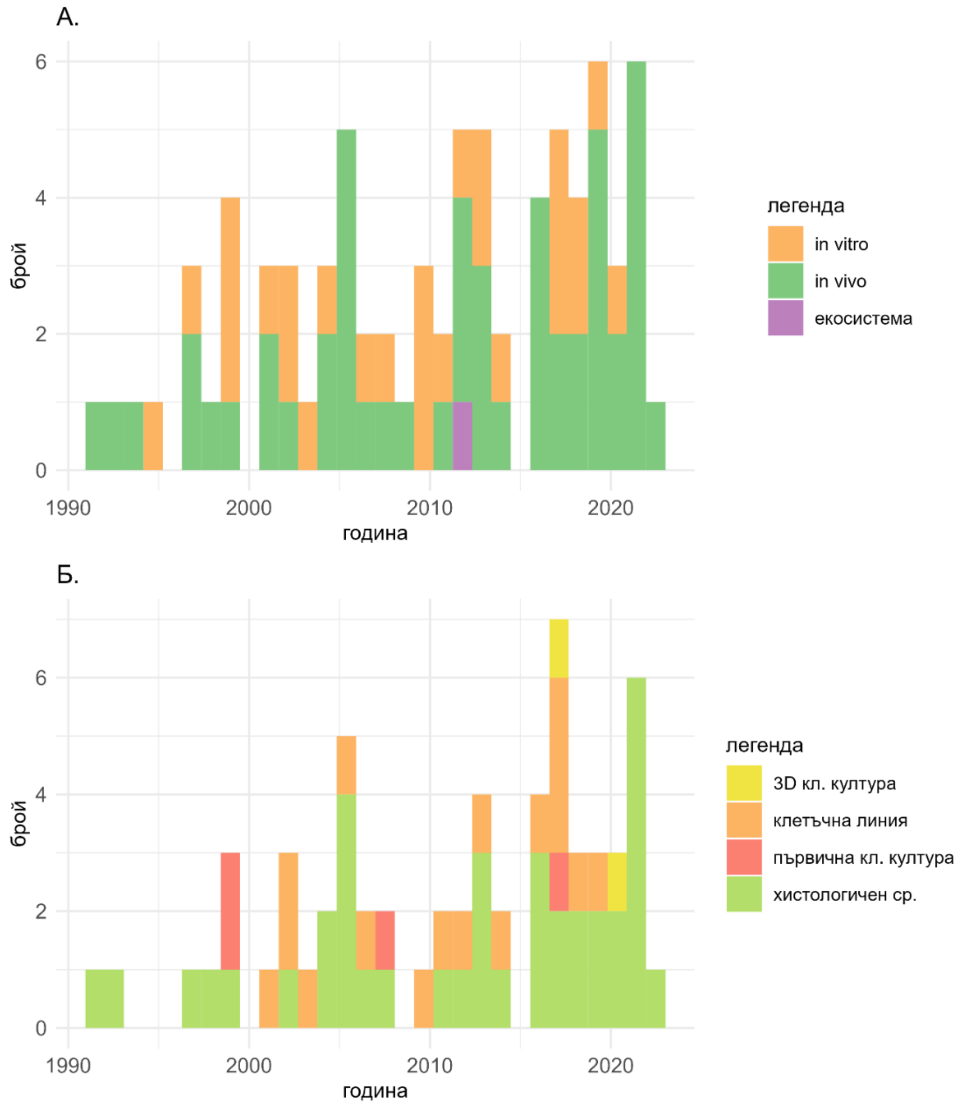
Следващи по ранг, с малка разлика с предходния клас, са публикациите в сферата на анализите за безопасност на храните. Пример за подобни публикации са тези, които изследват ефектите върху човешкото здраве на храни, замърсени с арсениеви съединения[250,273] и домоева киселина[232].

В последния клас на токсичност „на потребителски продукти“ присъства само една публикация, описваща анализа на разпределението в серия от клетъчни линии на сребърни наночастици в състава на продукти, при които е необходимо постигане на антибактериално действие[259].

Видът моделна система, в която се изследват токсичните ефекти, до голяма степен определя как следва да бъдат структурирани изображенията. Те трябва да отразяват процесите от интерес, настъпващи в разглежданите биологични единици и да позволяват адекватно тълкуване на наблюдаваните изменения. В тази връзка, изборът на тип изображения в голяма степен диктува и избора на подходящ протокол за анализ.

Представени са две свързани класификационни системи за охарактеризиране на експерименталните модели. Според това дали въздействието настъпва в рамките на живия организъм или в изолирани части от него, проучванията биват респективно *ин виво* или *ин витро*. В една от публикациите се описва и въздействие на надорганизмово ниво, поради което е добавен и клас „екосистема“ (Фигура 29 А.). Другата свързана класификационна система разглежда клетъчната организация на обектите в микрографиите (фигура 29 Б.).

Изразено преобладават публикациите, класифицирани като описващи *ин виво* проучвания (Фигура 29 А.). При хистологичните срезове освен особеностите на отделните клетки, е налице специфично взаимно разположение на клетките в тъканта, продиктувано от функционалната и структура. Макар че е възможно тъканни срезове да бъдат третирани с тест вещества *ин витро*, това не е честа практика при провеждане на експерименти. Причината вероятно е, че този вид експерименти имат недостатъците на *ин виво* проучванията, при които биват жертвани животни, без да се проявят предимствата, свързани с наблюдение на ефекти в контекста на целия организъм. По тази



Фигура 29. Разпределение по години на публикациите по темата, прилагащи определени видове моделни системи (А.) и по отношение на степен на организация на анализите за клетъчни изменения (Б.).

причина, обикновено анализ на хистологични срезове се провежда *ин виво*. Това е видно от сходството между разпределенията на *ин виво* и хистологични срезове в представените цветни хистограми (Фигура 29 А и Б). Мнозинството от тези публикации са публикувани през последното десетилетие. Токсични изменения могат да бъдат открити освен на ниво взаимно разположение и структурна организация[296], както е в хистологичните слайдове, така и на ниво отделна клетка. Например, тестът за идентифициране на пролифериращи клетки с маркера бромодеоксиуридин[230], който е приложимо както *ин виво*, така и *ин витро*.

Фракцията от публикации, прилагащи *ин витро* модели макар и по-малка, не е пренебрежима (Фигура 29 А.). Наблюдава се запазен постоянен интерес през годините. Сред *ин витро* тестовете се описват предимно такива с клетъчни линии[217,219,233] и по-рядко първични клетъчни култури[281,284], а напоследък, макар и рядко, 3D клетъчни култури[220].

Предимствата на конвенционалните *ин витро* клетъчни култури са, че са динамични системи, в които сравнително свободно могат да бъдат направлявани и оценявани клетъчните процеси. Например, при наблюдение на мигриращи клетки в 2D култура, може удобно да бъде измерено движението им, което лесно се постига с помощта на надраскване на монослой[297]. При диференциация на невробластомни клетки, може да бъде наблюдаван процеса на формиране на израстъци, наподобяващи неврони или дендрити („неврити“)[174]. Отклоненията в тях биват тълкувани в контекста на невронална токсичност[207] или ембрио- и фетотоксичност[218].

При 3D клетъчни култури като сфероиди[154], е налице предимството, че клетките взаимодействат помежду си и се формира известна структурна и функционална специализация, която донякъде наподобява ситуацията с хистологичните

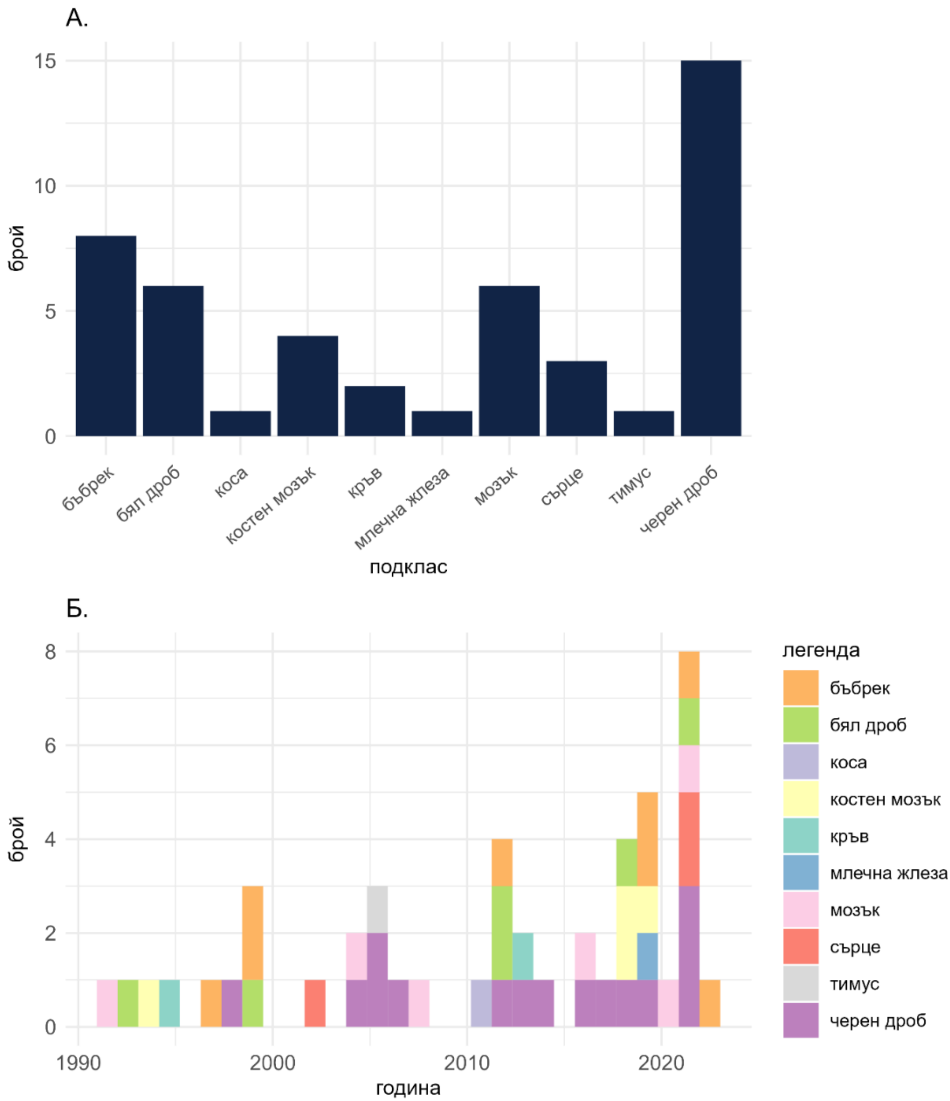
срезове. За разлика от срезовете, тази структура към момента трудно може да се доближи до комплексността на *ин виво* ситуацията, но пък прибавя нуждата от приложение на специални подходи за визуализация на триизмерно-разположените клетки, като обикновено е необходимо флуоресцентно маркиране и конфокална микроскопия[298].

Таргетна органна токсичност

Разпределението по органов произход на моделната система е функция на съвкупността от токсикологични и технологични съображения. Т.е., при неклиничните тестове се дава приоритет на изследванията на някои органи (например черен дроб) в сравнение с други (например панкреас). Възможно е и измененията в хистологични срезове с определен произход да са по-податливи на автоматизиран анализ на изображения в сравнение с тези от друг органов произход.

По отношение на идентифициране на вещества, увреждащи специфично определени органи, анализите на изображения най-често служат за охарактеризиране на черен дроб (Фигура 30). Тенденцията е с времето това да се запазва или увеличава. На второ място по честота на споменаване в селекцията са изследванията за ефекти върху бъбреците, чиито дял е постоянен във времето и подобни значението им остава актуално. През последните години се забелява струпване на значими публикации, съобщаващи за проучвания на кардиотоксичност и токсичност по отношение на костномозъчни клетки.

При токсикологичните изследвания, освен чрез хистологични срезове, определени физиологични процеси, могат да бъдат измерени и *ин витро*, за да бъде идентифицирано наличието на



Фигура 30. Органов произход на моделните системи, прилагани в публикации по темата. Количествено разпределение за целия период (А.) и по години (Б.).

отклонения от нормите, което е предпоставка за увреждане. Например, клетъчна пролиферация или ензимна индукция могат да бъдат определени *ин витро* в хепатоцити.

За определянето на таргетна органна токсичност, често се анализират хистологични срезове, измерват се нивата на маркери, увеличаващи се специфично при увреждане на конкретен орган, или пък се изследват ефектите върху *ин витро* култури, запазващи в известна степен характеристиките на съответните специализирани клетки, например хепатоцити, неврони, ендотелни клетки и др.

Вид биомаркер

Изборът на биомаркер зависи от патологичния процес, който следва да бъде идентифициран или измерен. Тъй като видовете биомаркери са изключително разнородни, за целите на настоящия анализ, те са обобщени или спрямо биологичното ниво на което са наблюдавани токсични изменения (органово, клетъчно, биохимично) или спрямо това към кой вид специфични тестове, изцяло зависещи от визуална информация, спадат.

Ниво на наблюдение на токсични прояви

Нивото на биологична организация, представена в изображението, е показателно за това доколко съответното приложение разчита на информация за механизмите на подлежащия процес или има по-скоро описателен характер.

Идентифицирането на прояви на токсичност като увреждане на ДНК, наличието на клетъчна смърт или тъканна дегенерация в определена фракция от клетките и в контекста на контролна група, е ясна индикация за наличие на токсичност. Подобен тип

тестове за различни механизми на токсичност са с най-голямо значение и анализът на изображения е широко застъпен при тях (Фигура 31).

Сред биомаркерите оценявани чрез анализи на изображения, основната част са на ниво биохимичен процес. Разделянето на измерваните маркери на физиологични и патологични е условно и по-скоро става въпрос за континуум. От Фигура 31 е видно, че има тенденция изследвания, фокусирани върху биохимични изменения чрез анализ на изображения да имат повече вътрешни цитирания през последните години. Въпреки това, предимно в периода 2005 г. – 2010 г. мнозинството от публикациите от селекцията разглеждат процеси на клетъчно ниво. Това съвпада с периода след популяризирането на FIJI i преди да придобият популярност U-net. Само няколко публикации, които разглеждат увреждане на ниво органи попадат в селекцията.

Специфични тестове

Както показват част от гореописаните анализи, в периода, откакто разглежданите методи се прилагат в експерименталната токсикология, някои специфични тестове, изцяло обвързани с визуални наблюдения са придобили популярност и са се утвърдили. Без компютърните анализи, те биха били изключително бавни, трудоемки, непрецизни и изискващи огромен човешки ресурс.

Сред специфичните тестове, разчитащи на визуална оценка, най-голямо значение имат тестовете за генотоксичност – кометният тест и в по-малка степен, тестът за микроядра.

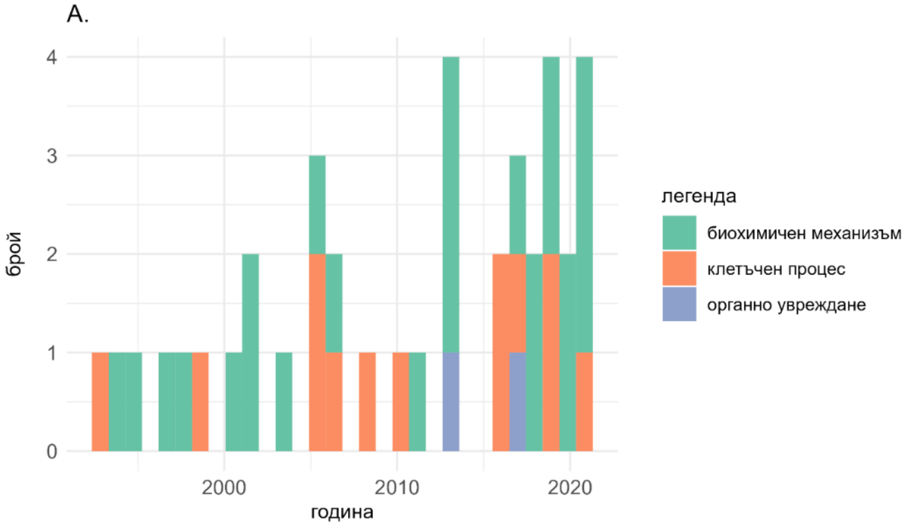
Кометният тест набира популярност през 1990-те години и още тогава проличава важната роля на анализите на изображения, като са разработени комерсиални софтуерни пакети, улесняващи

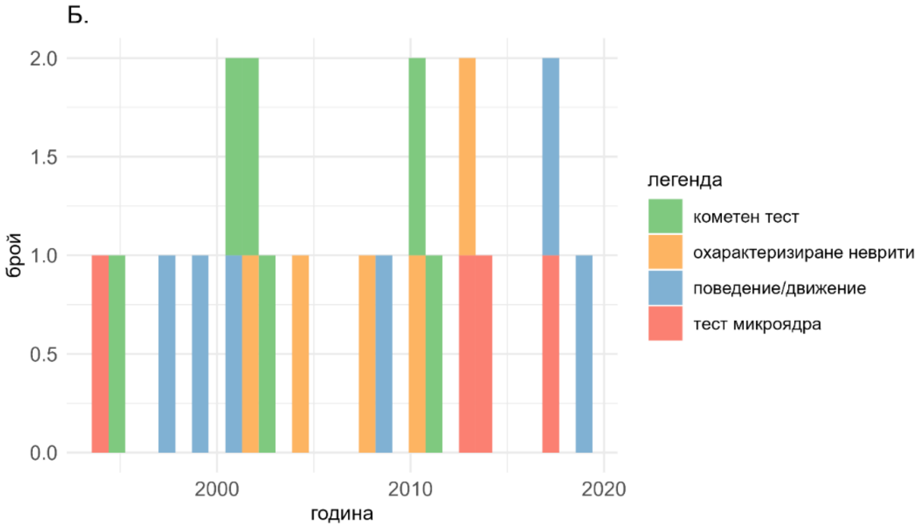
анализа на кометите. От Фигура 31 е видно, че сред анализите на изображения с най-голямо значение за областта на експерименталната токсикология, тези, прилагани за кометният тест, имат централно значение, което е видно и от нормализираните цитирания в цветната хистограма. Въпреки това изглежда, че след 2012 липсват локално значими публикации, свързани с този метод. Това вероятно се дължи на голямата интерлабораторна вариация, на трудността да бъде валидиран протоколът с помощта на въвеждането на подходи с по-голяма чувствителност. Може да се каже, че анализите на информация за промяна на позицията на обектите в пространството разглеждат поведението на анализираните обекти. Те обхващат не само микрографии, но и анализи на макроскопско ниво. Тяхното значение запазва позициите си от 1990-те години досега. На практика е трудно приложимо да бъде извлечена достатъчно обективна информация само чрез наблюдения и без автоматизирани анализи.

Друг вид специфични анализи с централна роля, са анализите на неврити, охарактеризиращи динамиката с която се изгражда мрежа от израстъци, водещи началото си от телата на клетки, диференцирани до невронален фенотип. Публикациите с най-голямо локално значение по темата са от периода 2002 – 2013 г.

Инструментариум

Гореописаните фактори: направление и цел на изследването, вид биомаркер, ниво на биологична организация на проявленията и вид протокол задават изисквания към съдържанието на подлежащите на анализ изображения. Съобразяването на всички тях е предпоставка за ефективен избор на вид техника за заснемане за нуждите на експерименталната токсикология.





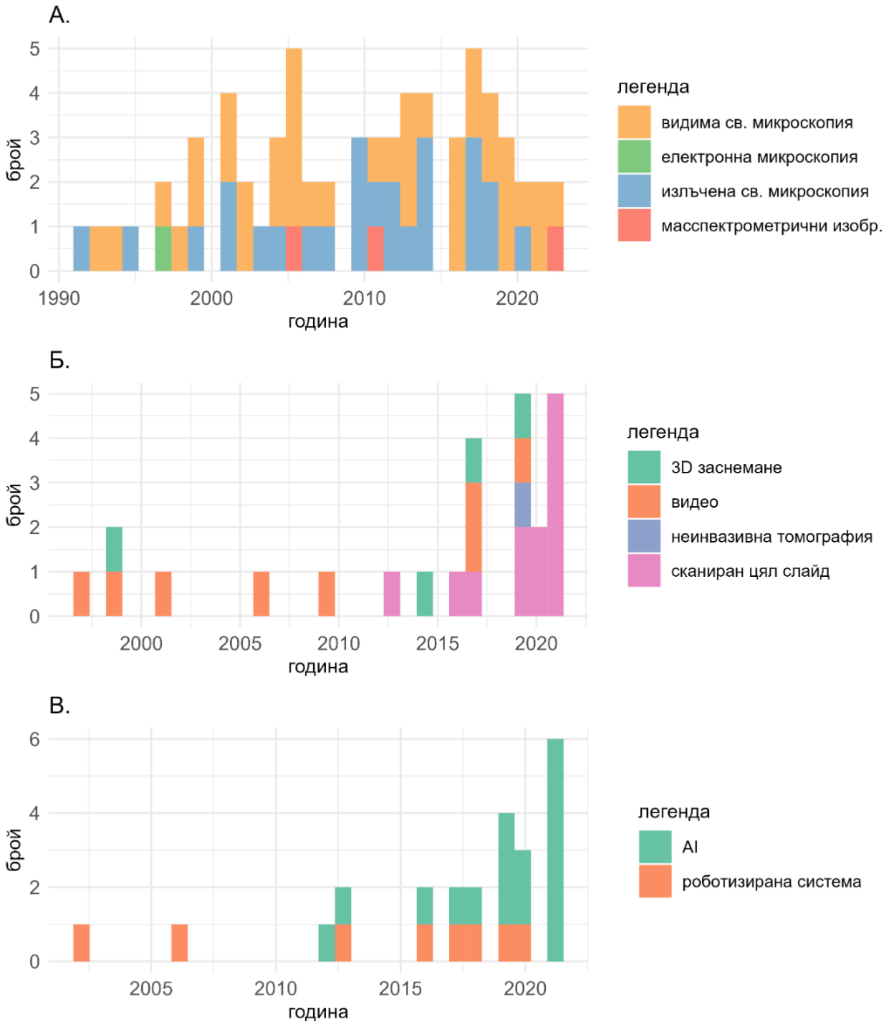
Фигура 31. Разпределение по години на публикациите по темата според биологичното ниво на изследване на тоскичните прояви(А.), и според приложението на специфични токсикологични методи, неразривно свързани с анализи на изображения (Б.).

Вид отчетен сигнал при формиране на изображение

Функционалността на един или друг алгоритъм зависи от типа биоизображение, към който е приложен. Особеностите на изображенията на ярко поле са различни от тези на флуоресцентните и електронно микроскопските, а всички споменати дотук значително се отличават от масспектрометричните изображения. Въпреки, че дълбокото обучение в голяма степен уеднаквява процесите, свързани с трениране на модели и анализ, точността на прогнозите е зависима от типа изображение. Разпределението на публикациите по вид отчетен сигнал показва достъпността на различните микрографски технологии и приложимостта на анализи на изображения към тях.

Към момента анализите на изображения в експерименталната токсикология имат най-голямо приложение върху микрографии, генерирани чрез обикновена, светлинна микроскопия (Фигура 32). Това е обяснимо поради най-голямата достъпност и приложение на различни видове микроскопи, работещи с видимата светлина. Този вид микроскопия позволява събиране на изключително богата спектрална информация и в същото време, е богата на артефакти и трудна за измерване на интензитет на оцветяване. Възможно е голяма част от недостатъците на изображения от светлинна микроскопия да могат да бъдат компенсирани с помощта на добре тренирани модели, базирани на дълбоко обучение[299]. Анализите на хистологични срезове са инвазивна техника, при която срезът е фиксиран, оцветен и рядко остава жизнеспособен.

Флуоресцентните микроскопи, макар и сравнително по-малко достъпни, са втори по значение (Фигура 32), тъй като при изображенията, генерирани с тяхна помощ са удобно и много подходящи за анализ. При тях артефактите типично са сведени



Фигура 32. Разпределение по години на публикациите по темата според вида отчетен сигнал от техниката за заснемане на изображения (А.), според приложението на многомерни изображения (Б.) и според това дали повишената производителност е постиганата чрез роботизирана апаратура или софтуерни приложения на AI (В.).

до минимум, понеже излъчената светлина е сведена до маркираните със съответното флуоресцентно багрило компоненти на клетката светлина. По този начин, обектите могат да бъдат по-лесно сегментирани, тъй като между тях липсва фоново осветление и по същата причина, може да бъде точно измерен интензитета им, който е пропорционален на количеството флуоресцентен маркер и биологичния компонент, който е оцветен с него. Поради тези причини, кометният тест е успешен метод за определяне на генотоксичност чрез оцевтяване на ДНК в клетката с флуоресцентно багрило и анализ на това колко компактно е локализирано излъчването при гел електрофореза, което зависи от степента на фрагментация.

Многомерни изображения

Както вида сигнал, така и наличието на многомерна структура са определящи за подбора на алгоритми за анализ. Заснемането на подобни комплексни изображения е свързано и с някои допълнителни хардуерни изисквания към заснемащото устройство. Разпределението на публикациите спрямо тази класификация отразява наличието на предпоставки за приложение на въпросните многомерни изображения в токсикологията.

Анализът на изображения за токсикологични цели, макар и рядко намира приложения и върху изображения, генерирани чрез по-малко достъпни техники като електронна микроскопия и масспектрометични изображения (Фигура 32).

Размерите на многомерните изображения, генерирани в рамките на един експеримент лесно може да надхвърлят терабайт и това обстоятелство, което би могло да наложи инфраструктурна адаптация както на софтуерно, така и на хардуерно ниво.

На второ място по значение за експерименталната токсикология са анализите на видео, или неговата разновидност – времеви серии (time-lapse). Този вид изображения позволяват да се анализират промени във взаимното разположение на обектите и скоростта, с която се случват. С помощта на машинно обучение, сложни и трудни за описание от оператор комбинации от поведенчески прояви в опитните животни могат да бъдат идентифицирани, измерени количествено и съответно, класифицирани като патологични, или не[300].

<u>Високопроизводителни подходи</u>

Всички типове изображения, от двумерните монохромни, до многомерните, са носители на сложни данни, изградени от количествени, пространствени и евентуално времеви и допълнителни физикохимични променливи. За получаването на възпроизводими резултати за приемливо време, следва заснемането и анализите да бъдат прилагани в контекста на подходи за повишаване на производителността. Те могат да се състоят само от софтуерен компонент или от софтуерен и хардуерен компоненти (роботизирани системи). Разпределението на публикациите спрямо това дали прилагат софтуер с известно ниво на автономност (AI) или роботизация е показателно за съвременното състояние на съответните подходи в контекста на разглежданата тема.

Двата подхода, HTS и AI не са взаимоизключващи се, а напротив, развитието на системите за HTS зависи от приложенията на AI. По отношение на подходите за повишаване на продуктивността при анализите на изображения в токсикологията, тенденциите са на AI подходите да се придава по-голямо значение, тъй като са все по-достъпни и разпространени за разлика от роботизираните системи за заснемане и анализ на изображения (Фигура 32 B.).

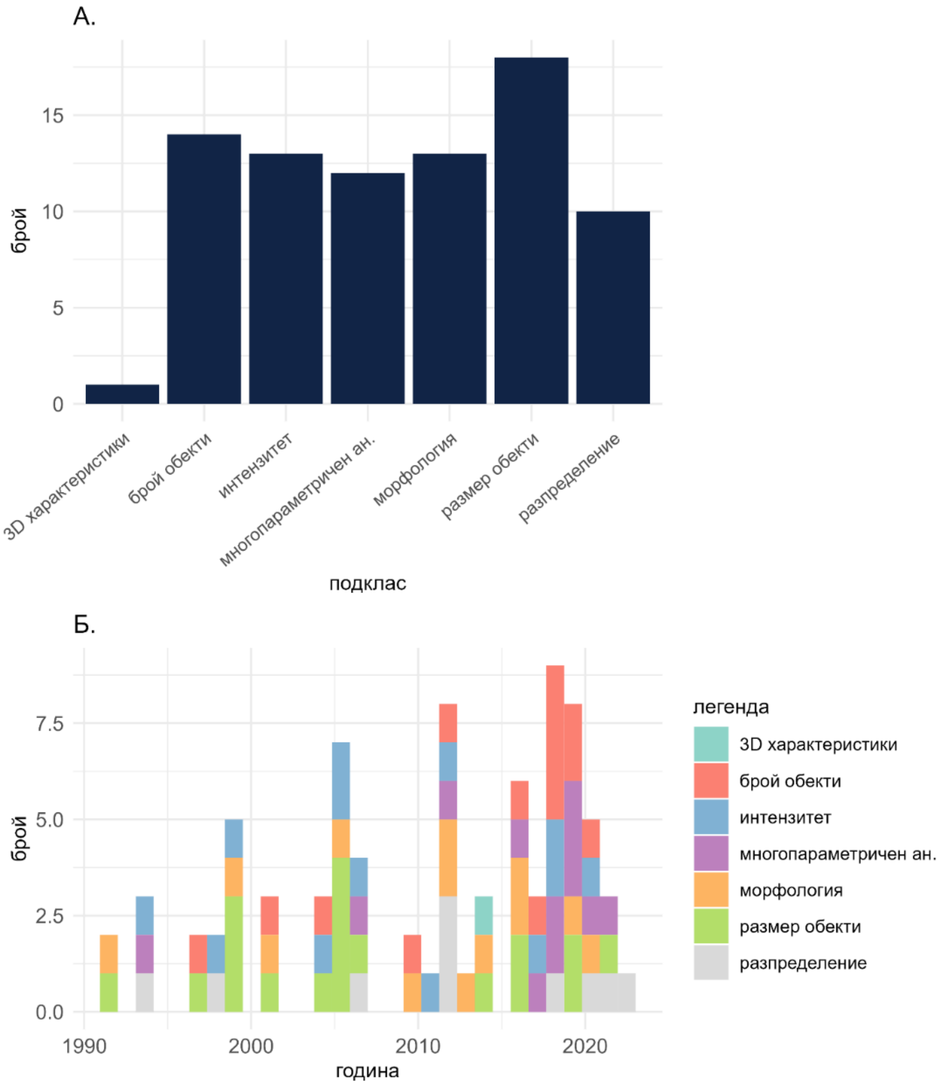
Висока производителност може да се постигне благодарение на приложението на автоматизирани процеси, изпълняващи алгоритми от повторяеми опеации върху големи серии от изображения, но също така и на апаратура, която може да автоматизира операции като накапване в многоямкови плаки и заснемане на определени интервали от време на предварително определени координати и спрямо предварително заложени правила. Въпросните роботизирани системи са пример за т.нар. подходи, прилагани за високопроизводителен скрининг на биологичните ефекти на големи библиотеки от съединения (high-throughput screening, HTS).

Измерени характеристики

По-горе бяха разгледани тенденциите по отношение на целите, избраните показатели за анализ и техническите изисквания за осъществяване на експериментални токсикологични проучвания с анализ на изображения. В контекста на тези предпоставки, разпределението на селектираните публикации по вид измерван показател, е показателно за тенденциите определени параметри да имат повече или по-малко значим принос.

Преглед на локално цитираните публикации (Таблица 5) показва, че най-често прилаганите протоколи за анализ на изображения в експерименталната токсикология имат за цел да охарактеризират броя, размера, морфологията, разпределението в пространството, интензитета, 3D характеристиките или на базата на един или повече от тези показатели, да класифицират обектите или целите изображения (Фигура 33).

Най-често се прибягва до измерване на размера на обектите. Този вид анализ са сравнително лесни, стига преди това успешно да бъдат сегментирани и разграничени самите обекти. Това е



Фигура 33. Параметри, определени чрез анализите на изображения, съобщени в публикации по темата. Количествено разпределение за целия период (А.) и по години (Б.).

сравнително лесно постижимо при флуоресцентни микрографии, заради яркия контраст с тъмния фон, но с подобреното представяне и достъпност на дълбокото обучение, задачата става все по-лесно приложима и по отношение на микрографии във видимата област.

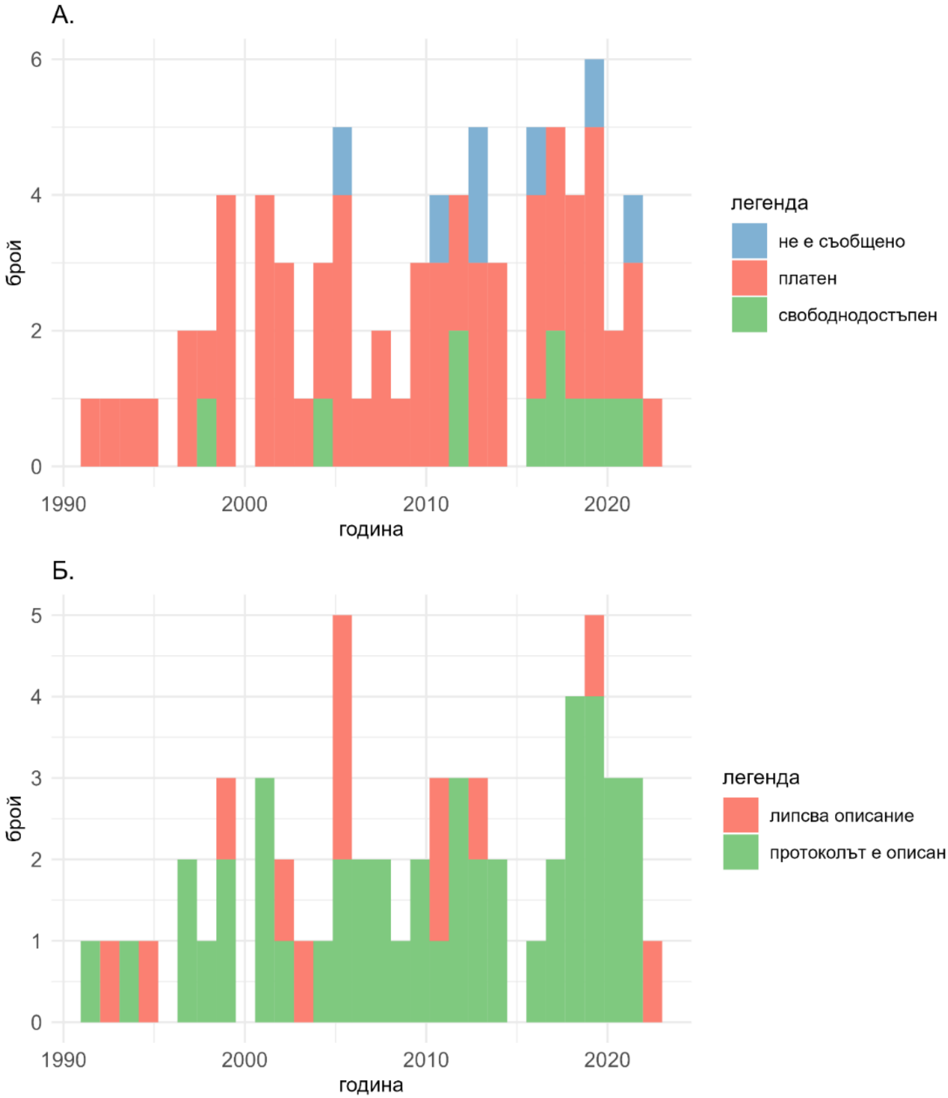
С изключение на 3D характеристиките, които са по-малко застъпени, вероятно заради по-малката достъпност на апаратурата за получаване на 3D изображения, всички останали споменати параметри имат сходно значение за изследвания период.

През последното десетилетие се увеличава сравнителното значение на измерванията на броя обекти, както и на многопараметричните анализи и класификация (Фигура 33 В.).

<u>Достъпност на софтуера</u>

Въздействието на разгледаните методи върху експерименталната токсикология зависи от разпространението и достъпността им. Това включва достъпността на апаратурата, софтуера и протоколите, както и наличието на активна общност, предлагаща помощ и решения на възникващите казуси. Както е посочено по-горе в труда, подобни общности съществуват и бързо се разрастват. Представеното разпределение на селектираните публикации по отношение на достъпност на софтуер и наличие на аналитичен протокол показва в каква степен научният прогрес по темата може да бъде приложен и методологично внедрен в типична неклинична токсикологична лаборатория без специално предназначен за целта ресурс и без специално обучени кадри.

Ключова предпоставка за приложението на анализи на изображения е възможността веднъж разработен протокол,



Фигура 34. Разпределение по години на публикациите по темата, прилагащи платен или свободнодостъпен софтуер (А.) и според това дали е предоставена информация за протокола на приложения анализ на изображения (Б.).

след това да бъде адаптиран, използван и усъвършенстван от други. Този процес бива силно стимулиран, ако протоколите за анализ на избражения, прилагани към съответните токсикологични публикации биват публикувани с поне в известна степен представени детайли.

Проблемът с възможността данни и протоколи да бъдат повторно използвани, така че да не се дублират изилишно и по-ефективно да се разпределят усилията в съответната научна област, е добре исвестен и се полагат усилия да в посока на разрешаването му. Инициативата FAIR (findability, accessibility, interoperability, and reusability) е поставена през 2016 г. в публикация на Mark Wilkinson et al.[301]. Идеята е да бъде разработена и приложена на практика концепция за изграждане на инфраструктури, които да направят възможна и да улеснят повторната употреба на генерирана чрез научни методи информация в световен мащаб. Този принцип е приет и от изследователите в областта на анализа на

биоизображения[302,303] и е прието мнението, че следва да бива прилаган по отношение на дигиталната патология, когато това е удачно[210,304]. Мнозинството от статиите, описващи приложения на анализи на изображения в токсикологията, които са цитирани в общността споменават информация за стъпките за осъществяване на съответните анализи на изображения, като след 2005 г. повечето публикации в областта споменават поне в общи линии какви алгоритми са прилагани, което е предпоставка да бъдат възпроизведени в друго звено. Някои маркери на токсичност за неизменно свързани със специфични визуални наблюдения. Анализът на изображения има важна роля в подобни тестове поради сходната си функция и предимствата си в сравнение с човешката зрителна система.

Повишената достъпност на методите за анализи на изображения през последното десетилетие демократизира възможностите за

работа със специфични изображения, които поради добавяне на измерение като време, триизмерно пространство и комбиниране на поредици от изображения в макрорамка.

През последните 5-6 години се наблюдава как водещото приложение на методите за анализ на изображения в токсикологията е насочено към работата с дигитализирани микроскопски слайдове (Фигура 30). Те представляват съставни изображения, насложени като мозайка, така че да отразяват повърхността на целия хистологичен срез.

ОСНОВНИ ПОДХОДИ ПРИ АНАЛИЗ НА БИОИЗОБРАЖЕНИЯ

Подбор на софтуер за анализ на изображения

В този раздел са представени основни софтуерни продукти с приложение в анализите на биоизображения и техните особености.

Много софтуерни инструменти за анализ на изображения с течение на времето биват заменяни с по-добри аналози. Поради трудностите, свързани с поддръжката на софтуер, съвместим с цялата необходима софтуерна „екосистема“ която е актуална, постепенно отпадат от употреба продукти, които са разработени за конкретните цели на ограничена група изследователи, или пък са свързани с функционирането на конкретна апаратура.

По тази причина, е поставен акцент върху софтуерни приложения, поддържани от големи общности, които се стремят да увеличават съвместимостта с различни формати и възможността за интегриране между различни инструменти. Това увеличава шансовете им да просъществуват поне за няколко години, като повечето от тях са безплатни, със свободен достъп.

Платен софтуер и софтуер с отворен достъп

Традиционно, с пускането на пазара на инструменти способни да генерират качествени биоизображения, те се предлагат в пакет със софтуер, предназначен за конкретното приложение. С все по-масовата употреба на тези технологии, възниква необходимостта от унифициране на стандартите в съответната научна общност, което пък стимулира усилия в посока разработката на безплатен софтуер със свободен достъп[305]. Общността на изследователите, които с общи усилия надграждат функционалността на безплатните приложения, е огромна и тенденцията е техният дял да нараства спрямо приложенията с платен достъп. Това е видно от огромните усилия, вложени от организации като COBA и NEUBIAS, в изграждане на обучителни програми за най-актуалните методи, почти изцяло върху софтуерни приложения с отворен достъп.

Според функционалната структура

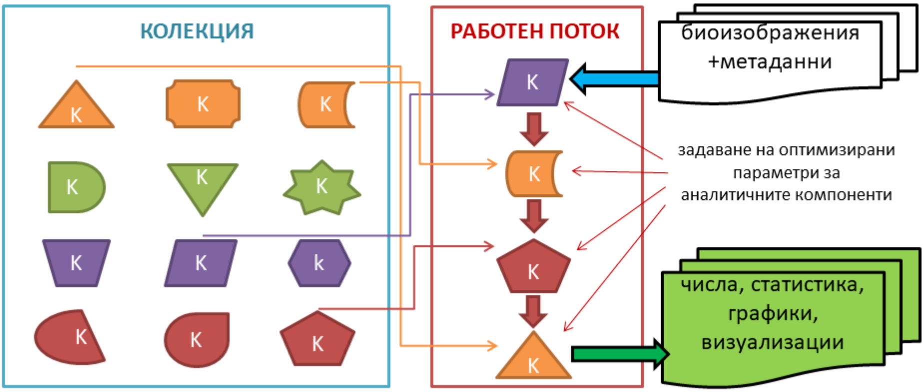
Miura и Sladoje [17] класифицират софтуерните приложения за анализ на биоизображения според комплексността им като колекции, работни потоци (workflows) и компоненти (Фигура 35). Компонентите, представляват алгоритми, специализирани в осъществяването на конкретен алгоритъм, представляващ стъпка от анализа. Повечето от популярните софтуерни приложения, представени в списъка по-долу (като FIJI, ImageJ, ICY), представляват колекции от компоненти. Работните потоци представляват протоколи, комбиниращи последователности от компоненти, необходими за осъществяване на практическа задача. Някои от пакетите, които могат да бъдат допълнително инсталирани към определена платформа или колекция, за да обогатят инструментариума ѝ, сами по себе си също могат да представляват немалки колекции (напр. TrackMate [306] и DeconvolutionLab2 [307]). Те могат да представляват и работни

потоци, в които след добавяне на тест изображения, подлежащи на анализ и задаване на съответните параметри, автоматично изготвят резултата (OpenComet[308]). Има и пакети за популярните софтуерни колекции ImageJ и разширената му разновидност FIJI, които са съставени само от един компонент, например пакета за линеен филтър Kuwahara[309]. Други софтуерни продукти също представляват колекции, които ръководят оператора през последователна поредица от стъпки и решения, в резултат на което накрая се формират работни потоци за сходни типове протоколи. Това е свързано със специализиране на софтуера в посока определен тип анализи и намаляване на приложимостта му за други. На подобен принцип са построени CellProfiler[310],[311] и прилежащият към него анализатор на извлечените от снимките числови показатели – CellProfiler Analyst [312]. Работните потоци могат да бъдат споделяни като изолирани от софтуерните им зависимости „контейнери" чрез приложения като Docker[313], което прави изпълнението им в различни системи възможно и улеснява споделянето[314] като намалява проблемите със съвместимостта с течение на времето. Работни потоци нерядко биват споделяни като репозитории в GitHub (github.com) и SourceForge (sourceforge.net).

Повечето софтуерни платформи, които са със свободен достъп и се поддържат от големи общности (напр. ImageJ, CellProfiler, R, Python, ICY, OMERO, Icy и др.) позволяват разработването и добавянето на модули за разширяване на функционалността с отделни компоненти или колекции от компоненти, които по желание на съответната общност могат да се наричат „библиотека", „пакет", „разширение", „add-on", „add-in", „plugin", „macro" и др. Модулният принцип е основополагащ в концепцията за някои видове софтуер, което е особено изразено при софтуера с отворен достъп Icy[315]. Icy е написан на Java и представлява платформа, която отлично се комбинира с други софтуерни продукти и концепцията му е да бъде улеснена и стимулирана колаборацията при разработка на нови съвместими

колекции. Интегрира се лесно с програмните езици JavaScript и Python, които са и основните, прилагани за дълбоко обучение, благодарение на библиотеки като ImagLib2, VTL, OpenCV и TensorFlow Manager.

Често, научният въпрос, на който анализът цели да отговори, е твърде специфичен за конкретния дизайн на експеримента, конкретния тип изображения, получени с конкретното оборудване в определена лаборатория. В тези нередки случаи,



Фигура 35. Видове софтуер според комплексността. Връзка между компонент (К), колекция и работен поток (workflow). Колекцията е софтуерна платформа (например FIJI), съдържаща набор от отделни алгоритми (напр. дилатация), наречени компоненти (К). Работните потоци са последователности от подбрани за нуждите на конкретния експеримент компоненти, които анализират суровите изображения като преобразуват информацията в тях и извличат смисъл, който ни интересува (например процент на клетки с определена морфология, третирани с тест вещество и сравнение с контрол). Адаптация по Miura and Sladoje (2019) [17].

работният поток се налага да се преработи по специфичен начин на базата на опита и познаването на компонентите от съответния изследовател.

Според дизайна на експеримента и взаимовръзката между обектите от интерес в анализираните изображения, може да бъде предпочетен един формат за записване на изображения, спрямо друг заради разлики във вида данни и метаданни, които поддържа. Например, ако е нужно сравняване на елементи, получени чрез различни канали или видове изображения на едно и също поле, на времева последователност или региони на интерес (ROI). Метаданните могат да бъдат от значение за работния поток, както и за проверка за съответствие на параметрите на анализите със съответните компоненти (например, вид приложен филтър, големина на ядрото му и др.). Това би ограничило риска от грешки при подаването на множество разнотипни изображения към работния поток.

Според начина на подаване на команди (интерфейс)

Налични са различни софтуерни платформи, които позволяват да се комуникира със софтуера по един или друг начин, или пък чрез комбинация от подходи. Традиционно, най-често се прави разграничение между управление чрез графичен интерфейс (GUI) и команден интерфейс (CLI), макар и да съществуват междинни положения като текстовия потребителски интерфейс (text-based/terminal user interface, TUI).

Графичен интерфейс (Graphical User Interface, GUI)

При този вид управление, командите се подават чрез типичните интерактивни визуални елементи като менюта, икони, бутони и полета за въвеждане на текст, чието състояние се променя с помощта на мишка, клавиатура или докосване върху сензорен

дисплей. Повечето софтуерни инструменти за биоизображения, като FIJI (ImageJ), CellProfiler, ICY, Ilastik прилагат GUI. Този тип управление е удобен, лесен и в реално време се виждат промените, настъпили в снимките в следствие на определено действие. При необходимост от осъществяване на голям брой повторяеми операции обаче, GUI има силно ограничен капацитет. Пример за проста за осъществяване такава операция е измерването на периметъра на отделни клетки. В зависимост от бързината на оператора, това може да отнеме минути, дори часове, ако става въпрос за десетки или стотици клетки в отделни снимки.

Текстов команден интерфейс (command line interface, CLI)

При този вид софтуер, повторяеми операции от горепосочения тип, а и много по-сложни, могат да бъдат осъществени за секунди, след като правилото бъде въведено в т.нар. терминал като последователност от текстови команди или като текстови файл. Командният език, който се използва, може да е подобен на използвания в Unix-базираните операционни системи (Linux, Mac OS) или пък на някой популярен програмен език (R, Python, JavaScript). Друго предимство на CLI, освен мащабируемостта е, че често прилагани последователности от команди могат да бъдат записани като текстови файл, почти без ограничения на сложността им. Когато се наложи, готовият файл може да бъде изпълняван повторно при директното му зареждане или след адаптиране и малки корекции. Основният недостатък на CLI е, че времето за формулиране на командите зависи в голяма степен от опита и уменията за програмиране на оператора. Типични примери за софтуерни колекции, почти изцяло базирани на CLI са пакетите, разработени за работа с програмните езици като Python[316,317], който напоследък набира популярност при анализи на биоизображения.

GUI модулно програмиране

Правени са опити да бъдат преодоляни неудобствата при работа с CLI. Модулното програмиране комбинира предимствата на GUI и CLI, като позволява построяване на работни потоци чрез подреждане на предварително подготвени блокове (модули, елементи) с помощта на мишка и клавиатура. След това, модулните работни потоци могат лесно да бъдат модифицирани и пресъздавани. Необходимо условие е да се свържат правилно и последователно входящите и изходящи (обработени от съответния модул) данни, както и да бъдат избегнати конфликти между модулите при оптимизиране на параметрите за провеждане на анализа. Така, от входящите данни след поредица от трансформации при преминаване през модулите, се получават резултатите на анализа на изхода. На такъв принцип функционират платформата Galaxy [318], KNIME[319,320] и някои системи за управление на хардуерни компоненти като LabVIEW[321] и MIT App Inventor[322].

Предимството на **KNIME** (Konstanz Information Miner)[319,320] е, че поддържа модули от алгоритми с различна насоченост, включително за машинно обучение, хемометрика, *ин силико* моделиране, извличане на информация от бази данни и др. Неговият GUI позволява удобна трансформация, адаптация и подредба на модулите. Лесно се интегрират разнородни видове информация от различни източници на данни. Могат да бъдат интегрирани модули за подготовка на данните за анализ с помощта на операции, присъщи за външен софтуер. KNIME може да бъде интегриран с ImageJ на базата на специално разработена за целта и вградена в KNIME среда за ImageJ, способна да изпълнява ImageJ макроси[323].

Платформата **Galaxy**[318] е безплатна и също позволява модулна организация. За разлика от Knime, тя най-често е инсталирана в локален или отдалечен сървър и се изпълнява в браузърен

прозорец. Налични са свободнодостъпни сървъри за изследователски цели (https://usegalaxy.org/). Galaxy е популярна платформа за транскриптомни анализи, като функционалността ѝ постоянно се разширява и към момента включва и компоненти за анализи на изображения и за машинно обучение.

MIT App Inventor[322] улеснява създаването на персонализирани мобилни приложения за управление на различни хардуерни конфигурации.

Софтуерът **Icy**[315] също позволява автоматизация на процесите чрез интерфейс за модулно програмиране.

Чатботове, базирани на големи езикови модели

Напоследък, с навлизането на все по-достъпни и усъвършенствани чатботове (напр. ChatGPT, Chat Generative Pre-trained Transformer на OpenAI и други подобни) ограничението, свързано с управлението чрез команди, е по-лесно преодолимо. Ако операторът дефинира ясно в свободен текст последователността от стъпки в желания алгоритъм и характеристиките на осъществяващите го функции, чатботът може да генерира командите и програмния код, който след адаптиране да е функционален. За това са необходими поне базови познания за начина на въвеждане и подредба на основните текстови команди.

Наблюдава се тенденция платформите за анализ на биоизображения да интегрират подобни чатботове, които улесняват подбора на подходящи функции и написването на CLI инструкции, за автоматизация на процесите за нуждите на конкретната лаборатория. **PathChat**[324] е софтуер, който може да комуникира чрез чат команди и да анализира хистологични

изображения, като освен това е обучен да отговаря на разнородни въпроси в областта на патологията.

Според основното предназначение

От интернет могат да бъдат изтеглени множество мощни софтуерни инструменти за анализ на изображения с отворен достъп[325], като няма инструмент, който да съчетава предимствата на всички останали на едно място, въпреки че създаването и окомплектоването на FIJI (ImageJ) е първото мащабно усилие в тази посока [88,325].

Анализ на изображения

Създаването на **ImageJ** и **FIJI** е резултат от комбинирането на богати софтуерни библиотеки с интуитивна среда за управление. FIJI (Fiji is just ImageJ) е най-разпространената софтуерна платформа с отворен достъп за анализ на цифрови изображения и най-масово прилаганият софтуер за анализ на изображения в областта на биомедицинските научни изследвания досега. Първата версия на този софтуер е пусната в употреба през 1987 г. и се нарича NIH Image (NIH – National Institutes of Health). ImageJ се появява 10 години по-късно, а версията FIJI – през 2005 г,[88]. Както подсказва абревиатурата, FIJI съдържа същата софтуерна платформа като ImageJ, но за разлика от него, още с инсталацията е добавена богата начална колекция от допълнителни библиотеки (plugins), плод на приноса на стотици научни колективи, докато при базовия ImageJ, всеки подобен пакет трябва да бъде инсталиран поотделно, по избор на ползвателя, с цел да се избегне излишно претоварване на паметта на компютъра. И двете издания на ImageJ могат да бъдат надграждани с пакети след инсталиране. Подобни пакети с различна функционалност биват постоянно разработвани от голямата общност, поддържаща ImageJ/FIJI. Работата със

софтуера е улеснена чрез процедура за подпомагане на формулирането на алгоритми за автоматизиране на операциите. Т.нар. “macro recorder”, или macro записвач, позволява на изследователи без предварителен опит в програмирането да компилират желаните последователности от алгоритми в macro файлове, съобразени с техните нужди. Чрез macro записвача се записва на т.нар. macro програмен език последователността от функции, съответстващи на ръчно осъществените операции. Записаната последователност лесно може да бъде адаптирана и вмъкната в т.нар. macro файлове, които по-късно да бъдат изпълнени върху друго изображение или съвкупността от всички изображения, съдържащи се в посочена директория. Въпросната автоматизация осигурява възпроизводимост и скорост, несравними с ръчната обработка на изображения. Друго предимство на ImageJ е, че е базиран на Java и е съвместим с различни операционни системи (Windows, Linux, Mac OS). Освен това, подлежащата софтуерна архитектура на ImageJ е в процес на пренаписване, така че да е адекватна на съвременните изисквания (ImageJ2).

Голямата общност от ползватели и разработчици на подобни свободнодостъпни софтуерни продукти постоянно създава ресурси за надграждане на функционалността, обучителни материали за ползватели на различно ниво и форуми, в които са документирани различни подходи за справяне с разнородни затруднения пред ефективното приложение на софтуера. Усилията на общността са предпоставка и за това, че ImageJ е съвместим с редица други софтуерни платформи (CellProfiler, ImgLib), с помощта на инициативи като Bio-Formats[102] и ImageJ Ops[326].

Тази отворена система за колаборация се реализира като успешен и продуктивен подход за адаптиране и еволюция на софтуера през последните повече от две десетилетия и той става

все по-предпочитан пред множеството платени софтуерни решения за анализ на изображения.

Напоследък се увеличава броят на библиотеки за ImageJ, базирани на машинно обучение и дълбоки невронни мрежи, достъпни за употреба с минимална предварителна техническа подготовка [299,327,328].

CellProfiler[312] е свободнодостъпен софтуер, предназначен за автоматизирано измерване на фенотипните характеристики на голям брой изображения, всяко от които съдържа голям брой клетки. Управлението е интуитивно, което го прави подходящо за изследователи в биомедицинската сфера без предварителни технически познания и умения. CellProfiler е разработен от звеното за анализ на изображения в Broad Institute. Софтуерът ръководи потребителя през стъпките за подреждане на наличните модули до получаване на функционален работен поток. Така разработеният работен поток може да бъде приложен за автоматизиране на операциите върху множество изображения. Особено подходящи за подобен анализ са флуоресцентните микрографии, които са по-чисти откъм шум и с по-малко визуални артефакти в сравнение с микрографиите на светло поле. CellProfiler е подходящ за висока производителност върху много големи обеми от изображения. Подходящ е и за приложение на алгоритми за дълбоко обучение. Може да бъде използван в комплект със специално разработен за целта допълнителен софтуер – CellProfiler Analyst[312], който помага параметрите на идентифицираните от CellProfiler обекти да бъдат анализирани. CellProfiler може директно да бъде командван и като библиотека за Python, която е съвместима също и с ImageJ.

FSL[329] (от FMRIB софтуерна библиотека) е софтуерна колекция за анализ на ЯМР и други томографски изображения на мозък, написана на C++.

Програмни езици - платформи за специализирани библиотеки

Гореописаните GUI софтуерни продукти, целят модулност, бърза ориентация, лекота на употреба и достъп до широк набор от функции. Програмните езици служат като платформа за по-цялостен и гъвкав контрол върху всички прилагани операции, включително по отношение на мащабируемостта. Този вид софтуер е базиран на CLI управление, макар че обикновено се прилага в контекста на интегрирана среда за програмиране (IDE), която допринася за по-прегледния и подреден вид на информацията, с която се борави.

MATLAB е сред основните инструменти, използвани в процеса на развитието на анализа на изображения през последните две десетилетия. Той е платен, но има безплатна версия, наречена **GNU Octave**[330] (част от проекта GNU[331]). Налична е подходяща библиотека за анализ на изображения и защото позволява създаването на .exe приложения с графичен интерфейс, които могат да бъдат изпълнявани и на други компютри. MATLAB и GNU Octave са езици предназначени предимно за научни изчисления и решаване на линейни и нелинейни уравнения. За GNU Octave също е наличен аналогичен пакет за анализ на изображения като в MATLAB[332].

С масовото навлизане на приложения на AI в анализа на изображения, друг програмен език с отворен достъп и огромна общност, **Python**[317], е на път да измести MATLAB по отношение на анализа на биоизображения. Неговото приложение е особено удобно в съчетание с библиотеката за визуализация на изображения napari [333].

Друг програмен език със свободен достъп, който се поддържа от огромна общност и популярността нараства все повече, е **R**[145]. Той е специализиран в статистически анализи и визуализация на

данни. R позволява улеснено разработване на GUI, като използва браузърния прозорец за среда на управление (Shiny apps[334]). magick[335] е библиотека за анализ на изображения в R. Bio7[336] е софтуер интегриращ R и ImageJ в общ GUI и IDE за нуждите на анализи на изображения в областта на екологията.

Библиотеки за разширяване на функционалността на програмни езици

Napari[337] е библиотека за Python, позволяваща визуализация, анотация и анализ на многомерни изображения, съдържащи анотации, маски и слоеве от други видове информация. Napari съчетава интуитивен потребителски интерфейс с възможността за управление чрез CLI и команди за Python. Няма пречка в процеса да бъдат зареждани и допълнителни библиотеки за Python. Вече е наличен AI ко-пилот, базиран на голям езиков модел, който подпомага избора на функции и формулирането на команди и алгоритми. Съвместим е със стандартните структури от данни, присъщи на NumPy (вж. по-долу). Това, че функционира в рамките на Python, носи предимствата на множеството съвместими библиотеки за приложения на машинно и дълбоко обучение. Общността, създаваща разширения за Napari се разраства с големи темпове през последните години, а с това и функционалностите му и възможностите за взаимопомощ и обучение[333].

NumPy[338,339] е библиотека за Python, която съдържа функции за обработка на големи многомерни матрици, които имат отношение и към анализите на изображения. Написана е на C и позволява по-големи скорости на изчисленията от SciPy (вж. по-долу). NumPy е прилагана при откритието на гравитационите вълни[340,341] и за генерирането на първото изображение на черна дупка[339,342].

SciPy[343] представлява разширена колекция от модули за научни изчисления: линейна алгебра, интеграция, интерполация, оптимизация, Фурие трансформация и анализ на сигнали и изображения в Python.

Scikit-image[344] е библиотека за Python, съвместима с NumPy и SciPy. Съдържа базовите алгоритми за анализ на изображения, включително сегментация, геометрични трансформации, операции с цвят, филтри, определяне на морфология и разпознаване на специфични форми и характеристики.

PathML[345] е библиотека за Python, специализирана в AI, ML и DL и пригодена за всички операции, характерни за особеностите на големи и комплексни изображения като цели хистологични слайдове.

OpenCV[346] (Open Source Computer Vision Library) е библиотека, съдържаща функции за анализ на изображения, написана в C++ и съвместима с повече от един програмен език, включително Python, Java, MATLAB/Octave и R. От 2011 г., позволява приложението на паралелни изчисления, оползотворявайки графични процесори (GPU), което я прави подходяща за дълбоко обучение[347,348].

h5CellProfiler[349] е библиотека за R, позволяваща управление на функции за анализ на големи структури от данни, съдържащи информция за показатели на ниво единични клетки, получени чрез CellProfiler. Визуализацията чрез shiny app GUI през прозореца на браузъра е удобна и динамична.

Image Processing Toolbox[350] (кутия с инструменти за анализ на изображения) е библиотека за MATLAB, с чиято помощ са били разработени голяма част от работните потоци за анализи на биоизображения през последните десетилетия. Има аналогична библиотека, image, за безплатната версия GNU Octave[351].

Визуализация на специфични изображения

Някои изображения, като например изображенията, получени при сканиране на цели хистологични слайдове (пирамидни изображения) и 3D реконструкциите изискват софтуер, специално пригоден да улеснява визуализацията и работата с тях. Такива специализирани функционалности имат QuPath[100], Orbit Image Analysis [352], Cytomine [353] и napari [333]. И четирите софтуерни продукта са с отворен достъп.

QuPath е особено подходящ за работа с изображения с много големи размери, дори такива, които са твърде големи, за да е възможно да бъдат отворени в ImageJ. Позволява да се изберат отделни зони от слайда, в които с помощта на функции, достъпни чрез добавяне на библиотеки, могат да бъдат идентифицирани различни видове клетки. Съвместим е с macro езика за автоматизация в ImageJ.

Cytomine е уеб платформа с отворен код, създадена като "spin-off", или "издънка" на академичен проект, която насърчава споделен анализ на много големи изображения и позволява полуавтоматизираната им обработка.

Orbit Image Analysis се разработва от същата общност както **OMERO** и е подходящ за прилагане на вече тренирани модели чрез машинно обучение, налични в т.нар. "model zoo".

Управление на инфраструктурата, необходима за анализи на изображения

В публикация на Miura et al. (2020)[354], към гореописаните софтуерни класове по отношение на анализа на биоизображения се включват и такива с по-скоро инфраструктурно значение, като администриране на бази данни от биоизображения и

библиотеки, подпомагащи работата на платформите, съдържащи софтуерни колекции.

В звена, в които рутинно се заснемат серии от многомерни изображения, обемът от информация, която се генерира, съхранява и обработва може да е от порядъка на терабайти дневно. В този случай, тя няма как да бъде анализирана, визуализирана и споделяна в реално време на персонални компютри. За целта е необходимо да бъдат използвани единични или серии от отдалечени сървъри или облачни (cloud) решения. За да се координира функционалността на подобни сложни инфраструктури от инструменти с различно предназначение, се прилагат софтуерни колекции, които да са съвместими и да комуникират с повечето формати и процеси, характерни за най-често прилаганите при анализа на изображения софтуерни колекции. На такъв принцип функционира софтуерът със свободен достъп OMERO [355], съвместим с множество операционни системи и способен да интегрира и администрира съвместната работа на повечето големи софтуерни колекции, прилагани за анализ на изображения.

Управление на хардуер, свързан със заснемането на изображения

Пример за софтуер за управление и автоматизиране на работата на микроскопи с отворен достъп е Micro-Manager[356,357]. В известна степен, софтуерните продукти, които управляват хардуера, свързан с микроскопа, също имат известна инфраструктурна роля. Те съвместяват управлението на микроскопа, заснемането и запазването на снимки с разчитане, визуализация и анализ на преди това запазени снимки в условията на съвместимост с други софтуерни колекции като

ImageJ. Друга система, която може да администрира едновременно хардуер, софтуер и бази данни, е OpenBIS[358].

Софтуер за дълбоко обучение

Въпреки че може да бъде групиран като софтуер с конкретно предназначение, софтуерът, специализиран в приложението на дълбоко обучение, е представен в отделна глава, поради все по-нарастващото му значение в анализа на изображения. Управлението на софтуера при обучението и приложението на модели за класификация е лесно и не изисква предварителна подготовка. Въпреки това, познаването на конвенционалните подходи за анализи на изображения, като филтри, например, е полезно с това, че позволява на изследователя да прецени сложността на определен тип анализ и склонността към отклонение на трениралия модел. Този вид ориентация е ценна в контекста на трудния за разтълкуване механизъм на работа на веднъж обучения модел или т.нар. „ефект на черната кутия“ („*black box effect*“)[135]. Налични са редица свободнодостъпни инструменти за анализ на разнородни биомедицински изображения с помощта на дълбоко обучение [112].

Един от първите такива софтуерни продукти е **ilastik**[327]. Управлението му е лесно и удобно за потребителя заради интуитивния GUI, позволяващ интерактивна класификация, сегментиране и анализ на изображения. Представлява модулна софтуерна рамка, която под формата на работен поток, насочва процесите по трениране на класификатора за анализи на ниво пиксел и обект, сегментиране и проследяване на обекти. Веднъж трениран, класификаторът може лесно да се приложи към папка със снимки и да бъде оставен да осъществи изчисленията, които понякога отнемат значително време. Успешно се комбинира със **CellProfiler** и с **KNIME**.

ZeroCostDL4Mic[299] е колекция от работни потоци с разяснени стъпки, които се изпълняват в интерактивни Jupyter Notebooks в платформата Google Colab[359,359]. Тази платформа предоставя лесен за използване графичен потребителски интерфейс и свободен достъп до графични процесори. Не са необходими предварителни технически умения.

ImJoy[360] (https://imjoy.io/) е гъвкава, онлайн-базирана свободнодостъпна платформа, която може да бъде управлявана от браузъра. Целта и е да насърчи повторната употреба и „рециклирането“ на тренирани модели за дълбоко обучение в биомедицинската сфера. Възможно е разширяване на функционалностите му чрез добавяне на библиотеки за комбиниране на различни типове данни в процеса на дълбоко обучение и класификация. Освен данни, съдържащи се в изображенията, могат да бъдат обработвани и геномни данни от съответните онлайн репозитории. Също така, работата на приложението може да бъде проследявана и управлявана в реално време от мобилно устройство. ImJoy позволява изчислителният ресурс за осъществяване на поставените задачите да бъде разпределен между локални и отдалечени компютри. Възможно е да бъдат локално анонимизирани медицинските данни, използвани за трениране на моделите.

CDeep3M[361] (https://cdeep3m.crbs.ucsd.edu/cdeep3m) е друго интернет-базирано приложение със свободен достъп, позволяващо употреба на модели за дълбоко обучение от изследователи без предварителен опит и технически познания. Способен е да сегментира големи микрографии, включително триизмерни (3D) изображения, с помощта на предварително тренирани модели. Изчислителният ресурс за осъществяване на класификацията е осигурен от Amazon Web Services (AWS)[361]. Необходима е регистрация за ползването му.

Налични са модели, тренирани върху изразено разнородни биоизображения, като например CellPose (cellpose.org) и NucleAIzer (nucleaizer.org), които, по изключение могат да бъдат директно прилагани без адаптация чрез допълнителни стъпки на обучение.

DeepImageJ[362] е разширение (plug-in) на ImageJ, което позволява зареждането на предварително тренирани модели. DeepImageJ дава достъп до най-голямото хранилище за предварително обучени модели за дълбоко обучение (BioImage Model Zoo, също достъпно за ilastik, ZeroCostDL4Mic, ImJoy). Следователно, изследователи без предварителен опит могат лесно да обработват биоизображения с негова помощ. Очакванията са DeepImageJ да допринесе за по-широкото разпространение на подходите за повторно използване на модели за дълбоко обучение в биомедицинската сфера.

Друго разширение (plug-in) за ImageJ/FIJI, е **StarDist**[363], който използва невронна мрежа, базирана на U-Net[126]. Прилага метод за откриване на клетки, който е отлично адаптиран за работа с морфологични индикатори при класифицирането на различни видове клетки[364]. Друго разширение за ImageJ/FIJI с подобна функционалност е **CSBDeep**[365].

DeepLabCut™ е свободнодостъпен софтуер за оценка на измененията в разположението на тялото на животни или заснети части от животни (например крайник, сърдечните камери при съкращение и др.) във видео, съдържащо движения в две или три измерения. С отворен достъп е и се отличава с голяма ефективност и бързина. Гъвкав е по отношение на проследяването на движението в множество отделни части на тялото едновременно. Освен това, може едновременно да проследява множество животни в триизмерно пространство. Методът е базиран на трансферно обучение с дълбоки невронни мрежи, които постигат отлични резултати без да са необходими

предварително заложени маркери, (напр. оцветяване на части от тялото на животното преди заснемане). Приложим е към различни биологични видове и с негова помощ могат да бъдат идентифицирани широк диапазон от стандартни и патологични поведенчески характеристики. Необходимо е минимално количество данни за обучение на модела (обикновено са достатъчни 50-200 кадъра). Точността му може да се сравни с точността при ръчно етикетиране от оператор. Софтуерът е поддържан от Mathis Group във Федералния политехнически университет в Лозана, а версиите преди 2.1.9 са разработени в Харвардския университет [366].

Добри практики

При надзираваното DL работният процес обикновено включва първоначално обучение на произволно инициализирана мрежа с голямо количество ръчно анотирани данни. Обученият модел може да се използва и като основа за получаване на нов, подобрен за конкретната нововъзникнала нужда, модел. И в двата случая, е възможно да възникне объркване по отношение на валидността на прогнозите на модела. Uhlmann et al. (2022)[133] предлагат добри практики при вземането на решения по отношение на избора и употребата на модел. На първо място, е препоръчително да се избягва употребата на модели, за които няма подробна документация. Моделите, които представляват интерес следва да бъдат предварително тествани върху малък сет от добре подбрани, добре познати наши анотирани изображения. По възможност, е добре да се запознаем и с отзиви във форумите, или в научни публикации, посветени на анализа на биоизображения. След като се ориентираме в наличните модели, е добре да се придържаме към един и да не го променяме твърде често, за да имаме възпроизводими резултати. Може да бъде използвана и група от няколко различни модела, за да бъдат сравнявани резултатите и да бъдат

идентифицирани отклоненията. Важно е да се има предвид върху какво е трениран моделът. Ако е обучен върху комплект от данни с преобладаващи снимки на неврити, много по-вероятно е той да открива нишковидни структури, подобни на неврити, дори реално да ги няма, в сравнение с модели, които не са обучени върху подобни снимки. Според Uhlmann et al. (2022)[133], добро начало за тези, които правят първи стъпки в употребата на предварително тренирани модели, е Bioimage Model Zoo (bioimage.io), тъй като е проектирана от голяма общност от авторитетни изследователи с опит в анализа на биоизображения. В помощ при преценката дали определен модел е подходящ могат да бъдат интернет-базираните приложения за тестване на модели, като например ML-SIM (ml-sim.com) и CDeep3M-Preview (cdeep3m.crbs.ucsd.edu/cdeep3m). Желатено е да се прилагат ясно разписани процедури за валидиране на параметрите на представяне на софтуера, но към момента за това са необходими експертни познания. Не на последно място, винаги е от полза да се направи опит конкретната задача да бъде разрешена чрез ясно дефинирани, конвенционални подходи, които при някои прости задачи с определени типове изображения, вършат отлична работа и за по-кратко време.

Често срещани грешки при приложание на машинно обучение

Измерител на това колко добре функционира определен метод на машинно обучение и съответният обучен класификатор, е т.нар. класификационна грешка – фракцията от случаите, в които класификаторът прави грешна прогноза, или разликата между прогнозираната и реалната стойност. В някои случаи, цената (последствието) на грешката може да бъде по-голяма в едната, отколкото в другата посока. Например, класифицирането на

определена зона като туморна е по-критично от диагностицирането на леки състояния.

Има риск, при неправилно приложение на методите за машинно обучение, прогнозата да не е толкова добра, колкото изглежда на пръв поглед. Ако данните от тестовете за ефективността на обучения класификатор (тест комплект) съвпадат с тези, използвани при обучението му (обучителен комплект), тогава доказателствената стойност, свързана с възможността на класификатора да генерализира прогнозите си върху нови, непознати данни, ще бъде неизвестна, т.е. резултатите от тестването ще са невалидни. За да се избегне тази грешка, винаги примерите за обучение и данните за тестване на ефективността, трябва да бъдат изцяло отделни групи.

Друга опасност, свързана с невъзможност да се определи ефективността на класификатора да идентифицира нови, непознати данни, е т.нар. прекомерно напасване *(overfitting)*. При него, на класификатора се дават нови и нови примери за обучение, докато не започне да класифицира тестваните изображения така, както бихме очаквали. Отчетената в така трениран модел прецизност най-вероятно ще е свързана със специфичните характеристики на напаснатия комплект обучителни изображения, но ако се подадат нови, непознати изображения, ефективността може да бъде влошена.

Достоверността на прогнозата зависи от сложността на класификационната задача, избора на метод за машинно обучение, количеството и характеристиките на комплекта от данни за обучение. Не бива да се забравя, че ако системата е обучена само върху снимки на здрави и некротични клетки и бъде приложена върху апоптотична клетка, тя винаги ще я идентифицира или като здрава, или като некротична.

Тенденции и перспективи

През последните две десетилетия са се появявали и отпадали множество софтуерни продукти[367]. Очаква се динамичното развитие и промените спрямо предпочитанията при избора на софтуер да продължат поне в близкото бъдеще. Към момента на написване на този труд се очертават няколко тенденции. Наблюдава се увеличен интерес към приложението на машинно обучение, което ще наложи необходимост да се подобрят и направят по-достъпни подходи за валидиране на моделите и за управление на риска, произтичащ от трудната за дефиниране природа на тренираните модели. Приложението на дигиталната патология и генерирането на мащабни изображения на цели слайдове ще доведе до развитието на инструментите за управление на инфраструктурата за съхранение и обработка на подобни изображения с помощта на отдалечени сървъри. С навлизането на приложенията на генеративния AI и чат ботовете, постепенно ще се увеличи достъпността на управлението чрез команден терминал с чат-бот асистент, който да превежда нарежданията на оператора от свободен текст в програмен код, разбиран и изпълняван от машината. Вероятно изследователската инфраструктура ще може да бъде мониторирана и до голяма степен управлявана дистанционно, от мобилното устройство, отново чрез разговор с чат-бот. Очакванията са, че ще се увеличи броят и качеството на достъпни предварително-тренирани модели върху бързо нарастващо количество от данни. Според някои изследователи, големите езикови модели ще доведат до интегриране на наличните софтуерни инструменти и възможността според необходимостта от конкретен анализ, чат-ботът да избира най-подходящия софтуер и протокол и едновременно с това да предлага нови, многофункционални решения. Някои от горепосочените мнения може да звучат пресилено, но те са изказани от професионалисти с опит и поглед върху актуалните тенденции в развитието на анализа на биоизображения[368].

Препоръки при избор на софтуер

Изборът на софтуер следва да бъде съобразен с нуждите на изследователя. Ако целта е да бъдат рутинно прилагани определени анализи за продължителен период от време, е препоръчително да се избере софтуер, позволяващ автоматизиране на процеса и притежаващ характеристики, които са свързани с предпоставки той да продължи да съществува за съответния период. Така, получаваните в лабораторията резултати ще бъдат генерирани по унифициран и съпоставим начин без да се налага инвестиране на време в разучаване на различни софтуерни решения. Най-добрата индикация, че определена софтуерна платформа ще просъществува е, ако има активна общност, която създава допълнителни библиотеки, активно обсъжда приложни въпроси във форуми, съобщава за грешки при функциониране и намира решения за тях. По този начин се постига т.нар. висок „BUS" фактор, или с други думи, броят членове на определен колектив, които ако бъдат блъснати от автобус, колективът няма да престане да функционира. Друга предпоставка за дълголетие на софтуера е, ако борави с унифицирани и лесно конвертируеми формати. Предимство е и да позволява осъществяване на изчисленията в отдалечени сървъри, или пък да комуникира със софтуер, управляващ отдалечени сървъри, тъй като към момента тенденциите са такива. Това е особено важно за анализите на изображения на хистологични слайдове. Показателно е и дали софтуерът поддържа функционалности, свързани с машинно обучение или пък съвместимост с други софтуерни приложения с такава функционалност. В тази връзка, предимство имат софтуерни продукти способни да използват графични процесори за паралелни изчисления и базирани на Python, TensorFlow, PyTorch (Java не е за предпочитане). При приложение на готови модели, базирани на дълбоко обучение, е препоръчително да бъде събрана достатъчно информация за начина по който моделът е бил обучен и тестван.

Батерия от методи за анализ на изображения в експерименталната токсикология

*Определяне на конфлуентност на монослой в двумерни клетъчни култури**

Приложения в експерименталната токсикология

Фазово-контрастната микроскопия и микроскопията в светло поле позволяват рутинно наблюдение на клетъчната пролиферация. В *ин витро* токсикологичните проучвания, някои клетъчни линии намират приложение като моделни системи за скрининг на таргетна органна токсичност на непознати съединения. Например, клетъчната линия HepG2 до известна степен запазва метаболитните характеристики на човешките хепатоцити. Цитотоксичните ефекти или ефектите водещи до изменения в клетъчната пролиферация, се отразяват на броя и гъстотата на жизнеспособните клетки. Съответно, конфлуентността или степента, в която клетъчният слой е заел повърхността на съда, няма как да остане непроменена. Предимство на визуалната оценка на конфлуентност е, че не предизвиква допълнителен стрес в клетките и може да се провежда многократно през определени времеви интервали или паралелно с други биологични тестове при многостъпални процедури. Оценката на конфлуентност може да се използва

---

*Протоколът е част от собствен труд, осъществен със съдействието на специалиста по информационни технологии, Иван Хр. Иванов и публикуван през 2019 г.[369]

като метод с потвърдителна стойност при съмнение за интерференция с тест протокола, например при полифеноли с MTT теста [370–372]. Освен за *ин витро* хепатотоксичност, описаният протокол може да се използва и с други клетъчни линии, предназначени за оценка на друг вид таргетна органна токсичност, например H9c2 клетъчна линия за *ин витро* скрининг на кардиотоксичност, A549 за инхалаторна токсичност, LLC-PK1 за нефротоксичност и C18-4 сперматогонии за репротоксичност. При тълкуване на резултатите трябва да се имат предвид ограниченията на приложението на клетъчни линии в *ин витро* условия.

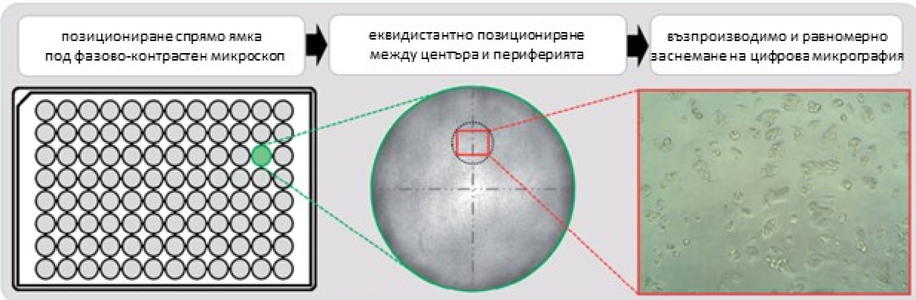
Подготовка на експеримент:

За експерименти с третиране за 72 h, HepG2 клетките биват накапвани в 96-ямкови плаки с концентрация около $1 – 2 \times 10^4$ клетки/ямка. Показаните по-долу резултати са от клетки, накапани в серия от концентрации ($0.25 – 8 \times 10^4$ клетки/ямка), за да се установи зависимостта между конфлуентност и жизненост, измерена по MTT-метода. След 24 h изображенията са заснети чрез 8-мегапикселова CCD (Charged Coupled Device) цифрова камера (Optikam Pro 8LT - 4083.18LT), монтирана на обърнат микроскоп Optika XDS-2, осветен от X-LED8TM система при режим на фазов контраст и увеличение 100×.

Анализ на изображения:

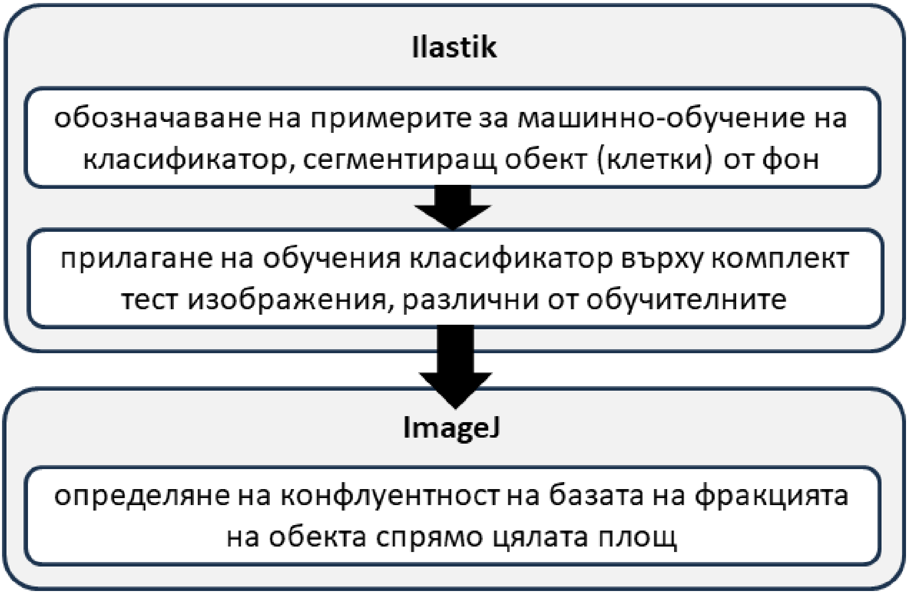
За целите на възпроизводимост на анализа, при заснемането е спазено правилото да бъде подбирана винаги част от ямката, която не е нито централна, нито крайна, за да се избегнат зони, в които може да има неравномерно натрупване на клетки, поради наличието на наклони и други неравности по повърхността на плаката. В центъра и по краищата, осветяването е най-неравномерно. Подходът за заснемане в 96-ямкови плаки е

представен във Фигура 36. В случая за сегментация на пикселите сме приложили софтуера ilastik, който е бърз, удобен и е бил достъпен към момента на провеждане на съответното проучване[369], но със същия успех може да бъде приложен всеки един софтуер, прилагащ дълбоко обучение за класификация на пиксели. Резултатът е бинарно изображение, в което на пикселите в частите на снимката, където липсват клетки, е зададена стойност нула, а на останалите пиксели, или тези, в чиито обхват попада клетъчният монослой, е зададена стойност 1 (или 255, в зависимост от настройките).



Фигура 36. Подход за избиране на зона за заснемане във всяка ямка на 96-ямкова плака, целящ осигуряването на максимално възпроизводими резултати. Адаптирана по Yordanov (2020)[369].

Основното предизвикателство пред подходите за анализ на изображения в подобни случаи е откриването на ясен критерий, спрямо който моделът да бъде инструктиран как да разпознае определена част от изображението: като заета от клетки, или като фон. Това се дължи на типичното за микрографиите, прилагащи видима светлина, неравномерно осветяване и светлосенки при фазовите граници. Тази задача не е толкова проста дори за човешкото око и съвсем не е тривиална за конвенционалните алгоритми за анализ на изображения (вж. Фигура 39). Това обаче не се отнася за методите за машинно и дълбоко обучение.



Фигура 37. Работен поток при анализ на конфлуентност на монослой.

Анализът може да бъде разделен на две прости стъпки (Фигура 37), които да бъдат изпълнени от една или повече софтуерни колекции. Тренирането на ilastik не изисква предварителна подготовка, понеже единствената стъпка преди анотирането на заредените примерни изображения, е определянето „на око“ на някои параметри на класификатора, които определят бързината и специфичността на работата му, в зависимост от обема на задачата (могат да бъдат зададени всички параметри, за сметка на известно забавяне на скоростта.

Самият софтуер ilastik въвежда в своеобразен работен поток. В процеса на анотиране на примерните изображения, обозначаваме с „цветни маркери“ как изглежда зона, заета от клетки, и как изгежда зона, където няма клетки. Препоръчително е, след като са зададени всички примери, тестването на

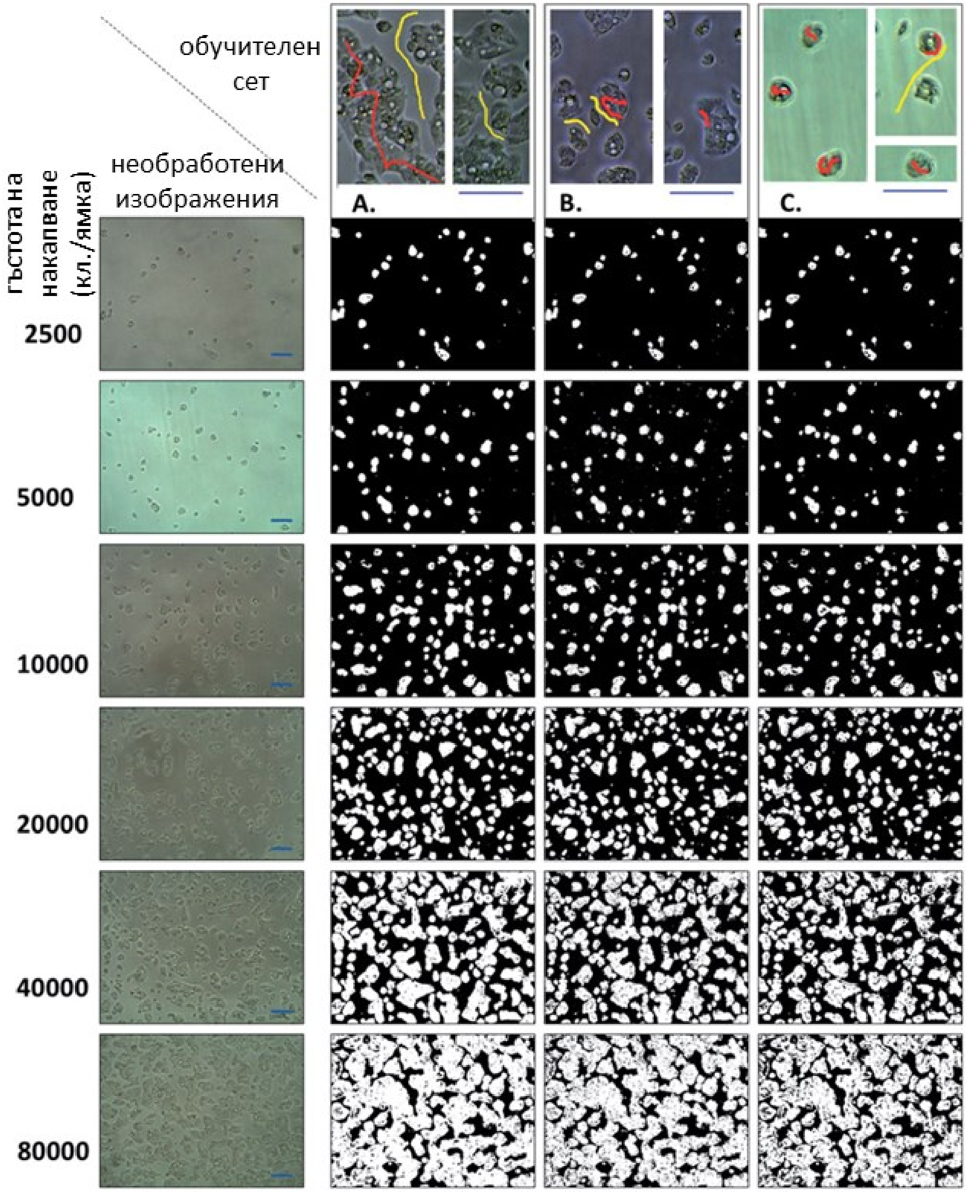
ефективността на класификатора да се осъществява на снимки, които не са били включени като обучителни примери. Веднъж обучен, на класификатора може да се подаде цяла папка с тест изображения, при което обработката им може да отнеме известно време (няколко минути или часове, според броя класове, броя снимки и хардуерните характеристики на машината). Ако се налага използването едновременно с това на компютъра, добра идея е процесът да се възложи на отдалечен сървър или онлайн приложение за анализ на изображения, представени по-горе в труда.

Получените бинарни изображения могат лесно да бъдат анализирани, за да се установи конфлуентността, тъй като е достатъчно да се пресметне фракцията на пиксели със стойност различна от нула, спрямо всички пиксели в изображението. За да бъде автоматизиран процесът, така че да бъде приложен наведнъж върху цялата група от получените бинарни изображения, е удобно да се приложи проста инструкция под формата на т.нар. макро код за ImageJ. Този, и някои други макро файлове са свободнодостъпни в GitHub репозитория (Фигура 38)

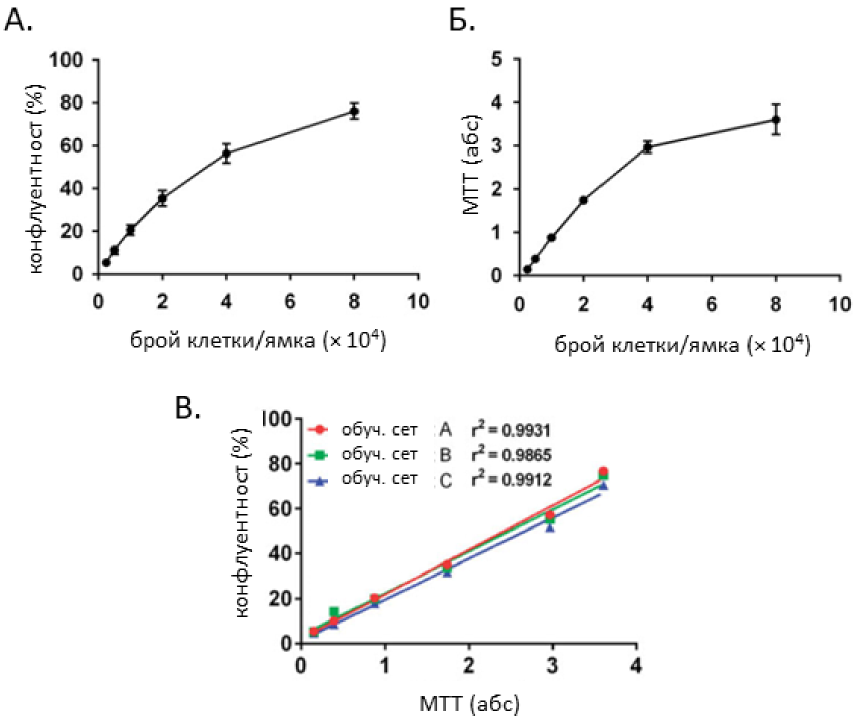
Фигура 38. QR код за достъп до GitHub репозитория на интернет адрес https://github.com/YIYordanov/ToxImgAn.

На Фигура 39 е видно, че при машинното обучение, дори с малко на брой примерни обозначения в разнородни като осветеност и степен на конфлуентност снимки, моделът дава сходни резултати. В зададените примери са приоритизирани зоните, които са гранични, т.е. по периферията на монослоя. Удобна функция на ilastik е, че може да показва зоните от снимката, в които тренираният модел може с най-малка сигурност да определи класа на пикселите. Снимките в най-горния ред на Фигура 39, заедно с маркираните примери за клетъчна площ (червен цвят) и фон (жълт цвят), са предназначени за обучение на модела, докато снимките в най-лявата колона са предназначени за валидирането му. Трите колонки с черно-бели, бинарни изображения, представляват резултата от прилагането на всеки един от трите обучени модела върху подадените снимки.

От Фигура 40. е видно, че и трите модела корелират отлично с резултатите от МТТ теста. Важно условие за този резултат е, че използваните снимки са субконфлуентни, т.е. все още има полета, които не са заети от клетки и в тях може да се осъществява безпрепятствено клетъчна пролиферация.



Фигура 39. *Обучение на модели за сегментация на изображения по отношение на монослоя в изображението.*



Фигура 40. Връзка между брой клетки и конфлуентност, връзка между брой клетки и жизненост, определена чрез МТТ-теста и корелация между конфлуентност и жизненост при приложение на трите тренирани модела, представени във Фигура 39.

Всякакви изменения в конфлуентността, доближаващи се до крайните случаи, когато има много малко на брой клетки или пък монослоят е почти или изцяло запълнен, може да доведат до неточен резултат по отношение на жизнеността, ако тя е базирана единствено на информация за монослоя. Имайки предвид това уточнение, анализът на конфлуентност с помощта на сегментация, осъществена с машинно обучение, е лесно приложим и достъпен метод, който може да послужи като

отлично допълнение или заместител на конвенционалните методи за определяне на клетъчна жизненост и пролиферация.

*Идентифициране на окръглени клетки с апоптотична морфология**

Приложения в експерименталната токсикология:

Апоптотичните процеси в клетъчните култури често са придружени от характерни морфологични промени като загуба на адхезия и придобиване на сферична форма от клетките[373–375] Видът клетъчна смърт има важно значение за токсичните механизми на тест- веществата. Подобни тестове могат да бъдат отлично допълнение към методите в една предклинична токсикологична лаборатория с уточнението, че самото заснемане е времеемък процес, освен ако апаратурата не е снабдена с моторизирана стойка.

Подготовка на експеримент:

Протоколът е приложим към различни адхерентни клетъчни линии, според научния проблем, който адресира съответния експеримент. В случая е използвана клетъчна линия от миши кардиобласти H9c2, тъй като се предполага, че тест съединението, обозначено с условното наименование R1, може да прояви кардиотоксични ефекти. Клетките са накапани в 96-ямкова плака с гъстота 1×10^4 клетки/ямка и оставени да престоят в инкубатор за една нощ. На следващия ден са накапани

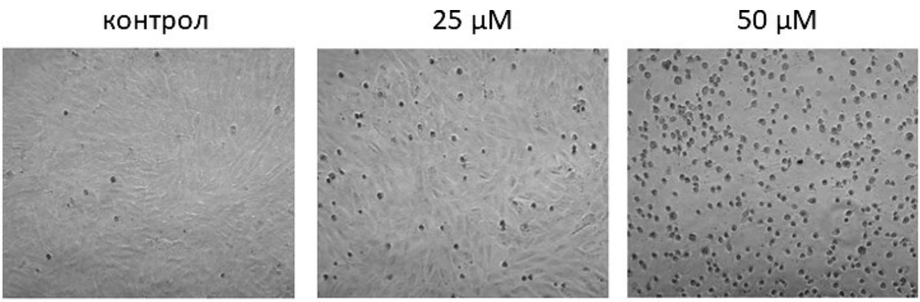
---

*Протоколът е част от непубликувано собствено изследване, проведено през 2021 г.

серия от концентрации на тест-съединението и след 72 часа са заснети микрографиите на същата апаратура, посочена в описания по-горе протокол.

Анализ на изображения:

Този тест може да бъде разгледан като вариация на представения по-горе тест за определяне на конфлуентност на монослой с тази разлика, че при обучението на класификатора, вместо два примера – клетъчен слой и фон, му се задава и трети такъв, който обхваща характерните окръглени, апоптотични клетки. Така, при приложението на модела, резултатът няма да бъде бинарно изображение с две стойности на пикселите, една от които е нула, а изображение, в което всеки пиксел може да заеме три стойности, включително нула. Поради това, следва да се внимава да не бъдат разменени стойностите, указващи монослоя и слоя, заеман от апоптотични клетки. Резултатът може да бъде получен по същия начин, както е указано във Фигура 37, или пък отново в ImageJ, да бъде приложена последователност от филтри (запълване на дупки и watershed),

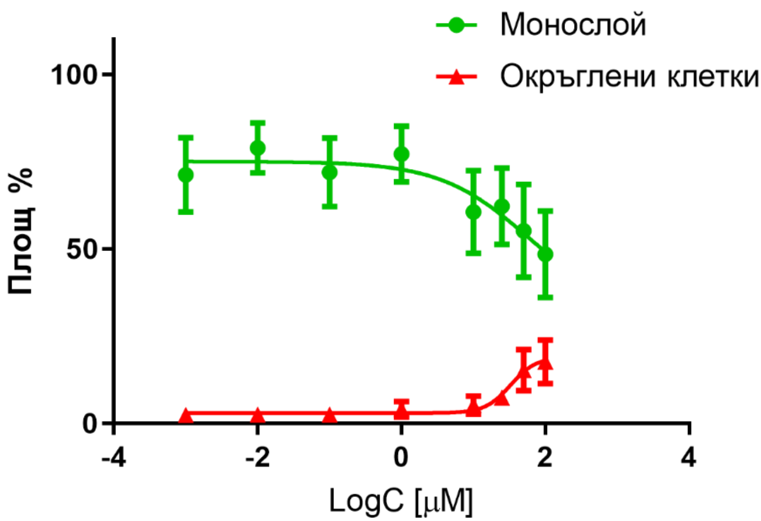


Фигура 41. Фазово-контрастни изображения на H9c2 фибробласти, третирани с две концентрации от вещество, което индуцира апоптоза и изображение, представящо нетретирана, контролна група.

които успешно да разделят допиращи се клетки, така че всяка от тях да придобие отделни очертания и след това да бъде приложена функцията „count particles“.

На последната функция може да бъде указано да брои само обекти, които отговарят на предварително заложени, емпирично-установени граници за интервал от размери, които очакваме да имат окръглените, апоптотични клетки, както и допустима степен на сферичност. Получените резултати показват, че е видно увеличение на площта, заета от окръглени, отделени от монослоя клетки с повишаване на концентрациите на цитотоксичното вещество за сметка на намаляване на конфлуентността като цяло (Фигура 42.).

На базата на получените от сегментацията обекти, може да се осъществи и друга разновидност на протокола, при която да получим конкретна информация за разпределението на морфологичните особености, размерите (включително бихме могли да анализираме текстурата, при положение, че добавим стъпка за снемане на очертания на сегментираните обектите и прилагането им към необработената снимка) на съвкупността от отделни клетки.



Фигура 42. Процент от площта на изображения на H9c2 кардиобласти, заета от какъвто и да било тип клетки (конфлуентност, зелен цвят) и заета от окръглени клетки, отделили се от монослоя (червен цвят) при третиране с нарастващи концентрации от метален комплекс с проапоптотично действие.

Ако приемем, че има фракции от окръглени клетки, проявяващи открояващи се фенотипни характеристики, бихме могли да ги групираме с помощта на методи за ненадзиравано машинно обучение или спрямо морфометричните характеристики чрез анализ на ROI с ImageJ/FIJI.

*Тест за миграция чрез надраскване на монослой**

Приложения в експерименталната токсикология:

Клетъчната миграция е свойство на клетките, което е от значение за правилното протичане на ембрионалното развитие[377], а след това, на способността най-вече на имунната система[378] и на съединителната тъкан[379] да осъществяват функциите си. Миграцията на фибробластите е решаваща за зарастването на рани, но и за формирането на цикатрикс[380,381]. Начинът на затваряне на раната (с цикатрикс или не) зависи от преобладаващия фенотип на участващите в процеса фибробласти[382]. Способността за миграция е определяща и за процесите на туморно метастазиране[383]. Субстанции, които драстично намаляват *ин витро* способността на клетките да мигрират, е възможно да имат имунотоксичен[384] или репротоксичен[385] потенциал. Обратно, субстанции които предизвикват силно повишение в скоростта на миграция, биха могли да осъществяват това чрез взаимодействие със сигнални пътища в клетките или по механизми за междуклетъчна комуникация[386]. Все пак, при интерпретацията на резултатите трябва да бъдат взети предвид и потенциални взаимодействия с условията в *ин витро* системата, които не е задължително да се проявят в *ин виво* условия. Идентифицирането на изразени ефекти върху миграцията е сигнал за по-детайлно обследване на свойствата на непознати тест-съединения.

---

*Протоколът е част от собствен труд, публикуван съвместно с Kalinova et al. (2020)[376].

Подготовка на експеримент:

За теста с надраскване на монослой е избрана фибробластна клетъчна линия, поради важната роля на процесите на миграция за физиологичните функции на фибробластите. L929 клетки с произход от миши фибробласти са накапани в 24-ямкови плаки с гъстота 3×10^5 клетки/ямка. Плаките са инкубирани за една нощ, за да има време да се утаят и прикрепят за повърхността на дъното на ямките. След това бива формирана „раната“.

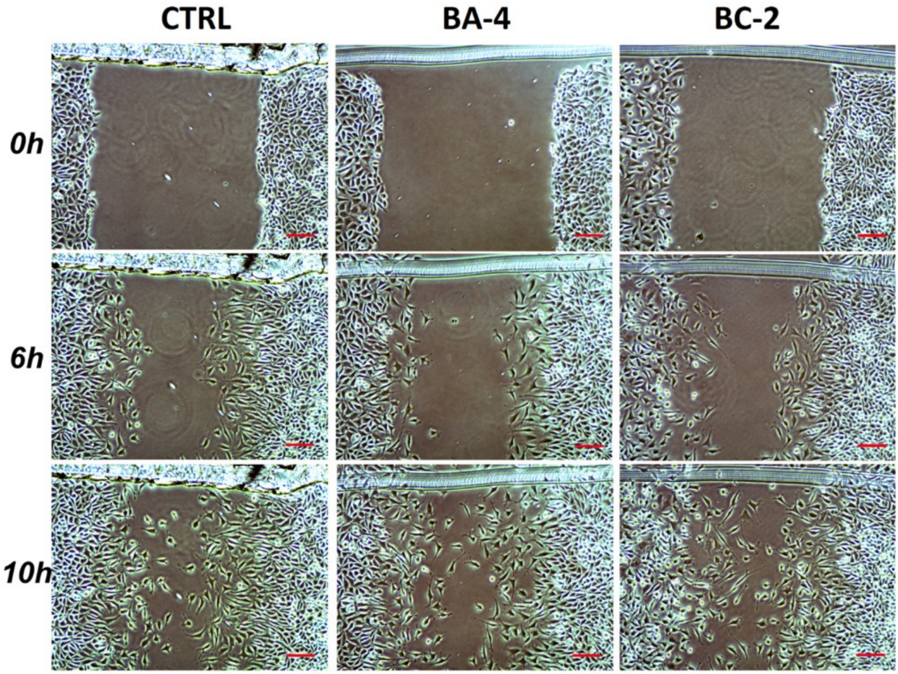
Т. нар. „рана“ представлява черта в монослоя, в която отсъстват клетки (Фигура 43). Тя се получава чрез отстраняване на клетки чрез надраскването му с връхче за пипета, като при нанасянето на всяка „рана“, връхчето трябва да се държи под сходен ъгъл и по възпроизводим начин да се прилага равномерен натиск[387]. След получаването на „раната“, ямките се промиват два пъти фосфатен буфер, за да не попаднат отново в областта на „раната“ част от отстранените клетки.

След това, към ямките се добавят дисперсии на тест субстанциите в хранителна среда и в концентрации, които биха били достигнати при потенциално *ин виво* приложение, или пък в концентрации, които са достатъчно високи, за да се проявят биологични ефекти, но са лишени от изразена цитотоксичност. В случая са тествани два блокови съполимера *(*BA-4 и BC-2) в концентрация 25 µg/mL, което представлява субцитотоксична концентрация.

Заснети са серия от фазово контрастни микрографии през определени времеви интервали. За да е възможна съпоставка, са заснети точно определени, еднакви участъци от всяка ямка. Първите изображения са заснети веднага след третирането (време 0 h), а последното – когато се наблюдава възстановяване на монослоя след повторното превземане на „раната“ от мигриращите клетки.

<u>*Анализ на изображения:*</u>

Анализът на изображенията е осъществен с помощта на MRI Wound Healing Tool[388], въпреки че към момента вече са налични и подобрени разширения като Wound healing size tool[297]. MRI Wound Healing Tool идентифицира областта на „раната“ на базата на това, че стойностите на пикселите са по-хомогенни в сравнение с тези в областта, заета от клетъчния слой. Така,

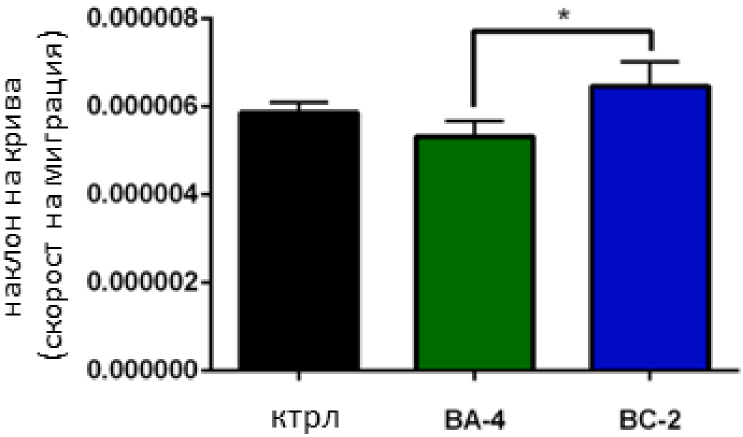


Фигура 43. Серия от изображения, направени 0, 6 и 10 часа след надраскването на монослоя от L929 клетки и третирането му с BA-4 или BC-2.

съпоставяйки площите на раната като функция на времето, за всяка една проба може да се изчисли наклона на кривата, пропорционален на скоростта на миграция (Фигура 44), или пък при налични само снимка в начално и крайно състояние, само да

се калкулират разликите между началната и крайната площ на раната. Процесът на миграция в течение на първите 10 часа след надраскването е виден във Фигура 43.

За да бъде получена обективна количествена оценка, на базата на стойностите на раните за всички проби и всички времена е извършена линейна регресия с напасване на кривата и наклонът за всяка проба е изчислен като показател за скоростта на затваряне на раната. Стойностите на изчислените наклони са сравнени с помощта на статистическия тест на Kruskal-Wallis за анализ на дисперсията.



*Фигура 44. Сравнение между скоростта на миграция на L929 клетки третирани с BA-4 и BC-2. Тест на Kruskall-Wallis, *p<0.05*

Резултатите от проучването показват, че третираните с BA-4 клетки мигрират по-бавно в сравнение с третираните с BC-2 (*$p < 0{,}05$). Въпреки това, няма статистически значима разлика между ефекта на коя да е от двете експериментални групи, третирани с дисперсии на мицели, спрямо контролата (Фирура 46).

*Кометен тест**

Приложения в експерименталната токсикология:

Кометният тест исторически е една от водещите причини понятието „анализ на изображения да навлезе трайно в средите на токсиколозите през 90-те години на миналия век[288]. При този тест наличието на фрагментирана ДНК в опашката, получена чрез електрофореза, се визуализира с помощта на флуоресцентна микроскопия. Като багрила се използват пропидиев йодид, етидиев йодид, YOYO-1 йодид, SYBR и 4',6-диамидино-2-фенилиндол[180]. Кометният тест е сред най-разпространените тестове, изискващи анализ на изображения[389]. Оптимизирани са множество алгоритми за анализ на заснетите комети. Някои от тях изискват мануален контрол за обработка на единичните комети във всяко изображение[389], а други са напълно автоматизирнаи и високо-производителни. През последните години методът бива донякъде изместен от други тестове за генотоксичност като γH2AX биомаркера, който има предимства по отношение на чувствителност и възпроизводимост[390]. Въпреки това, кометният тест запазва своята роля, тъй като е подходящ за оценка на генотоксични ефекти както *ин витро*, така и *ин виво*, без ограничения за вида клетки, които могат да бъдат изследвани. Освен това, кометният тест има множество модификации, които позволяват да се охарактеризира по-подробно генотоксичният механизъм [391].

*Протоколът е част от непубликуван собствен труд, проведен съвместно с ас. Любомира Радева през 2022 г.

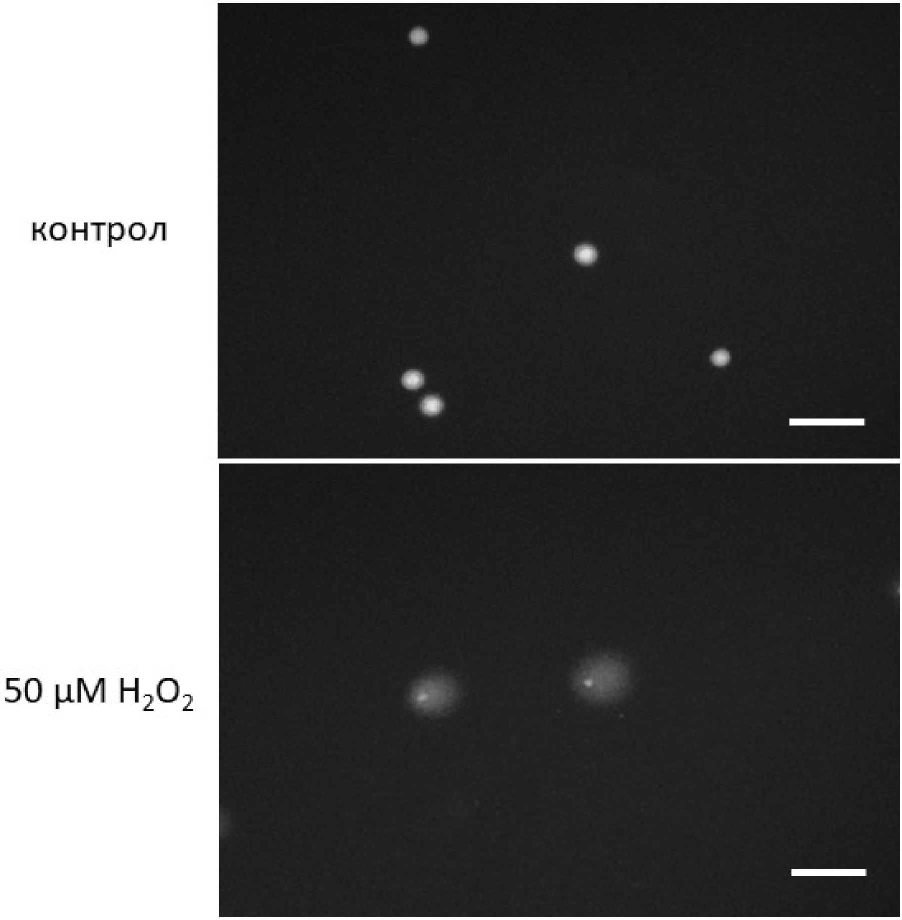
Подготовка на експеримент:

Вариантът на кометния тест, който е приложен е т.нар. алкален тест, при който има денатурираща стъпка, така че да бъдат идентифицирани както едноверижни, така и двуверижни разкъсвания в ДНК[392]. За ДНК багрило е избран сравнително по-малко токсичния SYBR Green[393]. Използвана е клетъчната линия L5178Y (дарение от Dr. M. M. Gottesman, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA), която е сходна с клетъчната линия, използвана в първата публикация за кометния тест[165] и е възприета за подходяща моделна система за тестване на генотоксичност[394]. Първоначално се подготвят слайдовете. Предметни стъкла се потапят в 1% агароза с нормална точка на топене и едната им страна се избърсва, така че да остане гел само от другата. Оставят се да изсъхнат през нощта, така че да остане тънък филм. След това се приготвя малко количество 0.7% агароза с ниска точка на топене, която ще бъде използвана като носител за добавяне на клетъчна суспензия към слайда след като е било осъществено третирането на клетките с тест вещества. Част от клетките са били третирани за половин час с 50 μM H_2O_2 в среда за клетъчно култивиране, а останалите са поставени в чиста среда (контроли), като и в двата случая гъстотата на клетките е 5000 клетки/ml среда. След края на третирането, клетъчната суспензия от всяка група се смесва с разтвора на агароза с ниска т. т. и по 100 μL от получената дисперсия се накапват върху предметните стъкла. Върху тях се поставят покривни стъкла и се оставят в хладилник (на 4°C за 10 мин), за да се втвърди агарозата. Покривното стъкло се премахва, отгоре се добавят 100 μL чист разтвор на агароза с ниска т. т. и отново се поставят покривните стъкла. Слайдовете престояват отново в хладилник за 15 мин. След втвърдяването на гела, покривните стъкла се премахват и слайдовете се поставят в лизиращ разтвор в хладилник за час и половина. След тази стъпка пробите са готови за електрофореза. Електрофорезата се осъществява в предварително охладена до 4°C хоризонтална ваничка, като е

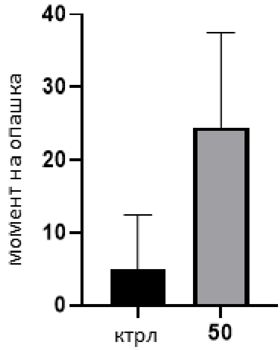
достатъчно разтворът да покрива слайдовете с около милиметър. Слайдовете се да престоят във ваничката за около 30 мин. След това се осъществява електрофорезата при поддържане на ниска температура за още 30 мин. Стъклата се промиват двукратно в неутрализиращ разтвор за по 10 мин, след това се потапят в 70% етанол за 5 мин и се оставят докато се изпари етанолът. Пипетират се по 50 µL SYBR Green върху всяко стъкло и отгоре се поставя предметното стъкло. Избягвайки достъпа до светлина, са заснети флуоресцентните микрографии на микроскоп Optika. Анализът на така получените изображения е осъществен в ImageJ с помощта на разширението OpenComet v1.3[308]. На софтуера се задава директорията, в която са записани микрографиите, като изискването е кометите да бъдат хоризонтално ориентирани в снимките. Ако осветяването в снимките е неравномерно по краищата, може да бъде отбелязана опцията за допълнителна корекция на фона (background correction), налична в менюто на софтуера. При пускането си, софтуерът идентифицира единичните, хоризонтално-разположени комети и пренебрегва тези, които допират контурите на изображението, или пък се допират или припокриват. След идентифицирането на кометата, софтуерът идентифицира главата ѝ. В резултат бива генерирано копие на микрографиите с наложени върху тях разпознатите очертания на кометите и главите им, както и с друг цвят, очертанията на пренебрегнатите в анализа комети. Информация за подлежащите на анализ комети се запазва под формата на таблица, в която присъстват редица показатели, описващи кометите. В нашия случай резултатите са представени

Анализ на изображения:

Фигура 45 показва снимки на клетки, подложени на кометния тест. Ако снимките имат зърнист вид, може предварително да бъдат обработени с филтър за конволюция (Гаусов или за среден интензитет).



Фигура 45. Флуоресцентни микрографии на L5178Y контролни клетки (горе) и третирани с водороден пероксид и претърпели разкъсвания на ДНК клетки, формиращи комети (долу).



Фигура 46. Момент на опашките на кометите по Olive след третиране на L5178Y клетки с водороден пероксид. Снимките са предварително обработени с Гаусов филтър. Представени са средните стойности и SD.

като момент на опашката по описанието на Olive[395]. Този параметър е подходящ защото взема предвид хетерогенността в популацията и отчита вариации в разпределението на ДНК в опашката (Фигура 46). Резултатът показва, че третирането с водороден пероксид за 30 мин увеличава средния момент на опашките по Olive (p = 0.07) (Фигура 46).

*Анализ на интензитет и тъканно разпределение на имунохистохимични маркери**

Приложения в експерименталната токсикология:

Компютърният анализ на изображения на хистологични слайдове е направлението, което през последното десетилетие

*Протоколът е част от собствена работа, публикувана съвместно с Georgiev et al. (2022)[396].

претърпява най-динамична трансформация поради навлизането на методи за анализ на изображения и най-вече на приложенията на AI и по-конкретно дълбокото обучение[397]. Въпреки усилията *ин виво* тестовете да бъдат изцяло заменени от *ин витро* алтернативи, не се наблюдава намаляване на значението на хистопатологичната оценка, а напротив, полагат се рационално насочени усилия за най-ефективното оползотворяване на информацията, която тя предоставя. Това е видно от огромните инвестиции, влагани за трансформиране на дисциплината чрез приложението на хардуерни и софтуерни инфраструктури, осъществяващи т.нар. процеси на „дигитализиране на цели слайдове“ под формата на огромни съставни изображения (мозаечни и пирамидни) и тяхното управление, анализ, архивиране и визуализация[150]. Значението на тези процеси е особено видно от резултатите от представения по-горе в труда систематичен обзор. Те показват, че се полагат усилията регулаторите да интегрират тази линия на иновации към документи като добрата лабораторна практика[398]. С развитието на комплексни 3D *ин витро* модели с предефинирана пространствена организация на съвместни клетъчни култури, може да се очаква, че анализът на срезове няма да загуби значението си, а напротив, ще продължи да играе важна роля[399]. Хистологичните срезове позволяват да се идентифицират не само прояви на таргетна органна токсичност (хепато-, нефро-, кардио-, невро-, костно-мозъчна-, белодробна, репродуктивна, кожна и др.), но и иначе трудни за идентифициране токсични прояви като пролиферативни ефекти, в следствие на експозиция с негенотоксични карциногени.

<u>Подготовка на експеримент:</u>

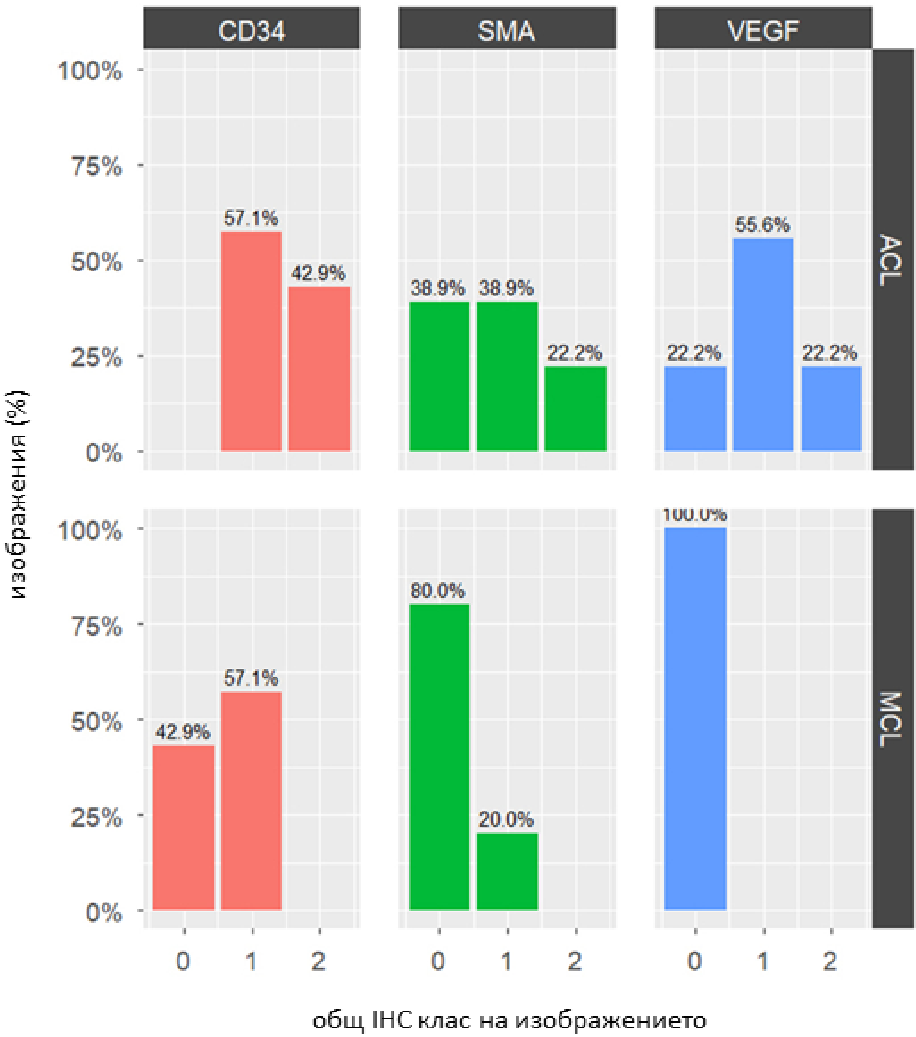
Настоящото изследване има насоченост към дисциплината анатомия, но принципите при анализ на хистологични изображения приложени тук са валидни и за анализите на

молекулни и биохимични маркери в неклиничната *ин виво* токсикология. Хистологични срезове от съединителна тъкан са депарафинирани, ендогенната пероксидаза бива блокирана и след неколкократно промиване с фосфатен буфер, са инкубирани с първични антитела за VEGF, CD 34 и α-SMA за час, след което са инкубирани с маркиран полимер и промити още веднъж. След това, срезовете са инкубирани със субстратния хромоген 3,3’-диаминобензидин (DAB). След промивка е приложено контраоцветяване с хематоксилин на Майер. Заснети за микрографии на светло поле с микроскоп Olympus CX 21 с монтирана камера Olympus C5050Z.

Анализ на изображения

Интензитетът на оцветяването е оценен чрез разширението за ImageJ, IHC Profiler[310]. Той категоризира всяко зрително поле в четири класа според степента на експресия на съответния маркер: силно положителна (3+), положителна (2+), слабо положителна (1+) и отрицателна (0). За целта, цветното изображение първо се подлага на деконволюция, при което се екстрахира цветния компонент, дължащ се на оцветяването с DAB. Поради вариациите в интензитета при цветните микрографии на ярко поле, директното отчитане на интензитет не е валидна опция за определянето на експресията на маркерите. Вместо това, на базата на деконволюциониия слой за DAB, се изгражда профил на разпределението на отделните полета в снимката и чрез процеси на вътрешна нормализация се формира цялостна оценка, която до голяма степен съвпада с експертните оценки на патолози [310]. От фигура 47 е видно, че по отношение на маркерите VEGF и CD34, делът на изображенията, класифицирани като положителни спрямо експресията е по-голям при изображенията на епилигамента на предната кръстна връзка, в сравнение с епилигамента на медиалната колатерална връзка. Въпреки че е неприложимо директно да се сравнява

интензитета на DAB между изображения, е възможно отделните изображения да бъдат сегментирани на формиращи тъканта клетъчни компоненти и да бъде пресметнато съотношението между средния интензитет за определен маркер два различни типа клетки от тъканта. Понеже съотношенията се правят за всяко едно изображение, разликите в осветеността и дебелината на срезовете между отделни изображения, би следвало да не фактор, изкривяващ резултата. За целта, първо се обучава модел за дълбоко обучение с помощта на софтуера Ilastik, който класифицира зоните на интерес (ROI) за съответните клетъчни съставни части във всяко изображение. След това, получените бинарни маски се налагат върху резултата от деконволюция на DAB чрез IHC Profiler. Изчислява се интензитета на съответните области в изображението, разделен на площта на съответната област. Между така получените осреднени интензитети се формира съотношение, което е представено обобщено за всички изображения на Фигура 48. Изборът на координатна система във Фигура 48 би могъл да бъде оптимизиран с цел яснота на представянето. При линейно представяне на ординатата, изменението в стойността при между двукратно увеличение или намаление на съотношението води до асиметрично

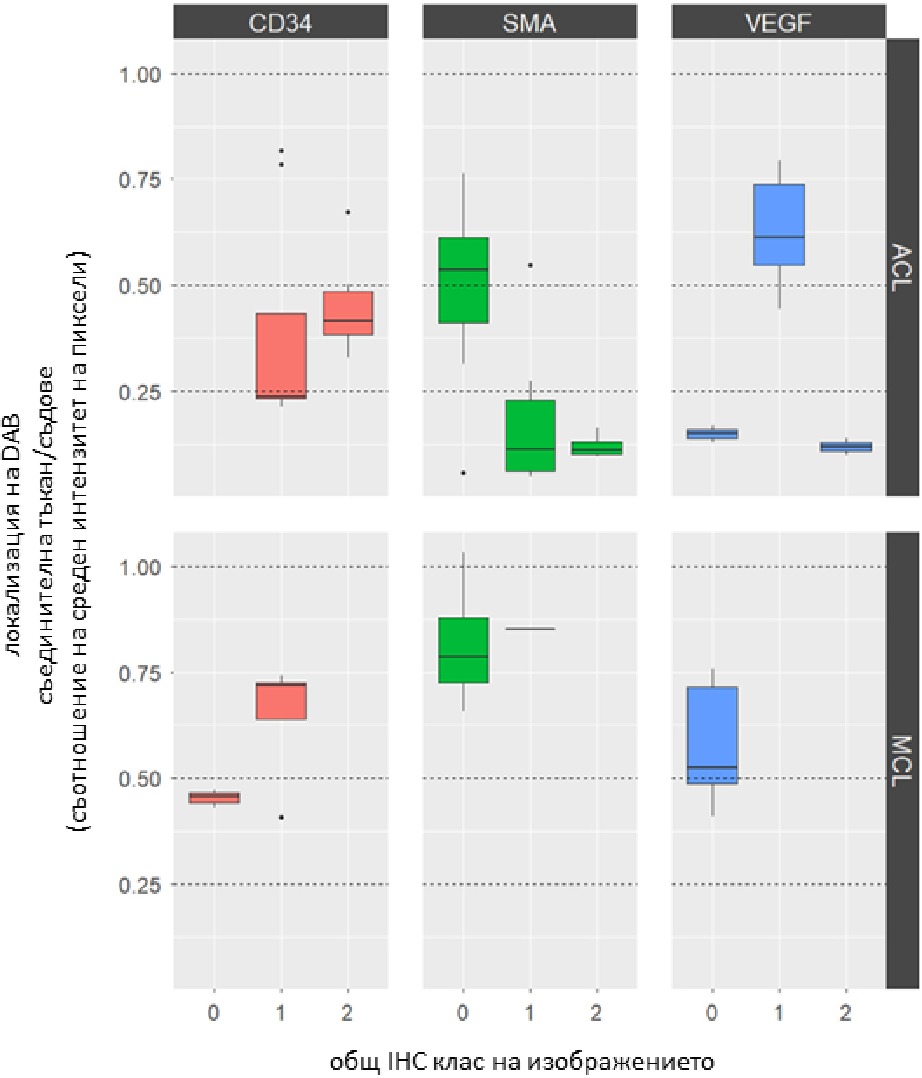


Фигура 47. Разпределение на изображенията по клас на експресия на маркерите CD34, SMA и VEGF в епилигамента на предна кръстна връзка (ACL) и медиална колатерална връзка (MCL), определени чрез анализ с ImageJ и IHC Profiler [396].

отдалечаване от състоянието на равнопоставеност (съотношение, равно на 1).

С други думи, двукратно увеличение на интензитета в знаменателя ще доведе до стойност 0.5, а двукратно увеличение в числителя, ще доведе до стойност 2. И в двата случая големината на ефекта е еднаква, но според субективната преценка за това кой маркер е по-важен за нас, отклонението в едната посока може да достигне най-много до стойността 0, докато в другата, до безкрайно високи стойности. За да се избегне въпросният субективизъм при визуалното представяне, съотношението би могло да бъде представено и като логаритъм с основа 2, при което равновесната точка ще бъде равна на 0, а всяко двукратно увеличение в едната или в другата посока ще води до еквидистантно отдалечаване на графиката с една единица.

Резултатите (Фигура 48) показват, че разпределението на гладкомускулния актин (SMA) в епилигамента на предна кръстна връзка и медиална колатерална връзка (MCL) се различават. В първия случай SMA е два до четири пъти по-концентриран в областта на съдовете, докато в другия случай, той е почти равномерно разреден между двата клетъчни комапртимента, което би могло да има отношение към разликите в способността на зарастване между двете връзки[400].



Фигура 48. Локализацията на експресията на маркерите CD34, SMA и VEGF, представена като съотношение между експресията в кръвоносните съдове и в клетките на съеднителната тъкан на епилигамента на предна кръстна връзка (ACL) и медиална колатерална връзка (MCL), на базата

на оцветяването с DAB. По-ниските стойности съответстват на по-изразена експресия в кръвоносните съдове, отколкото в съединително-тъканните клетки и обратно. Адапторана по Georgiev et al. (2022)[396].

*Анализ на навлизането на флуоресцентни молекули в клетките**

Приложения в експерименталната токсикология

Редица фармакологично- и токсикологично-активни вещества са способни да флуоресцират, например доксорубицин[401], блеомицин[402] и берберин[403]. Това е предпоставка за проследяване на навлизането им в здрави или туморно-трансформирани клетки, което зависи от транспортери като ABCB1, BCRP, MRP. Може да се проследи и влиянието на други вещества, като например инхибитори на ефлуксните помпи върху кинетиката на изпомпване на навлезлите вещества от вътреклетъчното, обратно към извънклетъчното пространство[404]. В наше публикувано изследване е приложена поточна цитометрия за определяне на скоростта на навлизане и освобождаване от резистентни лимфомни клетки на доксорубицин в лекарство-доставящи системи[401]. Въпреки че поточната цитометрия е метод, отличаващ се с много голяма чувствителност и прецизност, веднъж след като клетките биват анализирани, те биват изгубени. Флуоресцентната микрография има предимството, че могат да бъдат направени серия от снимки на една и съща проба, с уточнението, че в зависимост от

*Протоколът е част от собствено изследване, проведено съвместно с проф. Масимо Валоти в Университета в Сиена през 2017 г., все още непубликувано.

интензитета и продължителността на осветяването ѝ при заснемането, флуоресциращата молекула може да се разпадне и/или да се проявят известни фототоксични ефекти[405].

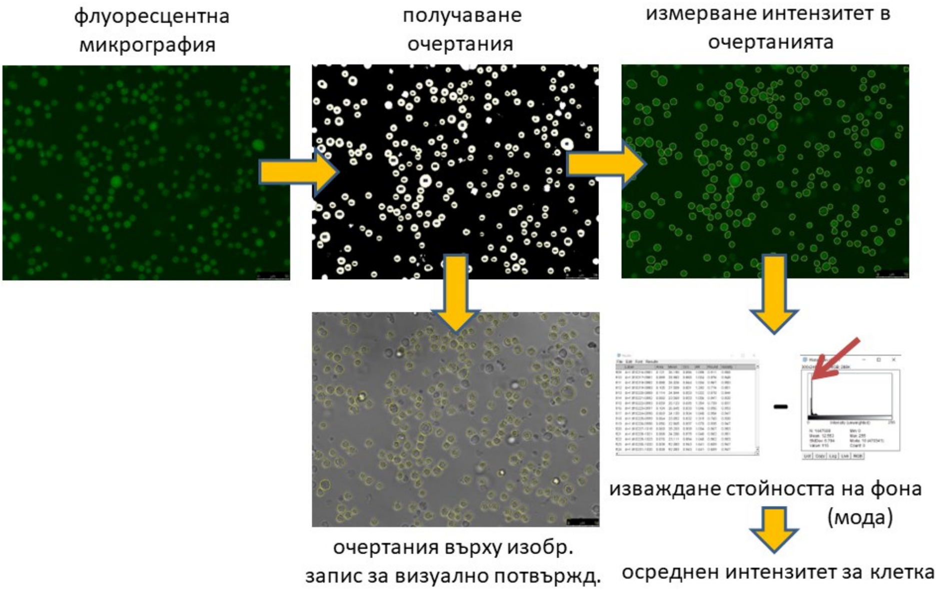
Подготовка на експеримент:

В 96-ямкова плака във всяка ямка се накапват по 10^4 L5178 MDR1 миши лимфомни клетки клетки, свръхекспресиращи човешки P-гликопротеин. Клетъчната линия е дарение от Dr. M. M. Gottesman (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA). За разлика от останалите представени *ин витро* протоколи в тази глава, въпросната клетъчна линия е суспензионна и не проявява адехерентни свойства към повърхността на плаката. Поради това третирането може да бъде осъществено още на същия ден, тъй като не е необходимо да се изчаква клетките да се захванат за повърхността на дъното на ямката. Клетките са третирани с 50 µM доксорубицин с или без добавен 10 nM тарикидар, който е селективен инхибитор на P-гликопротеина. Заснети са по една фазово-контрастна и съответната флуоресцентна микрография на първия, втория и четвъртия час. Използван е микроскоп Leica с монтирана камера и флуоресцентен канал L3.

Анализ на изображения:

Флуоресцентните изображения позволяват ясно открояване на флуоресциращите клетки на тъмен фон, при което прилагането на конвенционалното автоматично отграничаване (thresholding) в ImageJ постига бързи и добри резултати по отношение на сегментацията на обектите в изображението. В резултат се получават бинарни маски. За да бъде анализирана флуоресценцията във всяка отделна клетка, е необходимо да бъдат идентифицирани очертанията и координатите им и запазени като т.нар. зони на интерес (ROI). За целта, първо се прилага операцията за запълване на „дупки“ или малки групи от

пиксели в обхвата на обектите, които поради шум са неправилно отбелязани като фон (черен цвят).



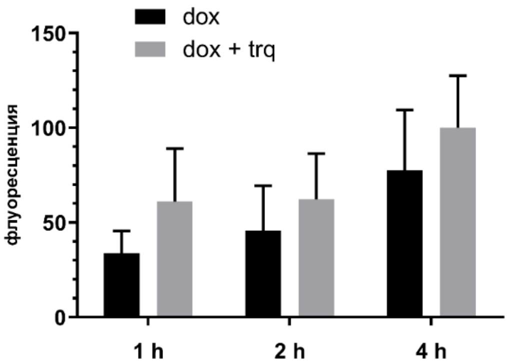
Фигура. 49. Структура на работен поток за определяне на осреднен интезитет на флуоресценция на субстанция в единични клетки. От флуоресцентната микрография (горе вляво) се получава бинарно изображение и се свалят очертания (горе в редата). Очертанията подлежат на визуална проверка при налагане върху фазово-контрастното изонбражение (долу, централно) и се прилагат отново върху първоначалната флуоресцентна микрография за измерване на интензитета на пикселите във всяка единична клетка (вдясно). За получаване на крайните стойости, от стойностите се изважда интензитета на фона (долу вдясно).

Тази операция е необходима за приложението на следващия, вододелен филтър, който прокарва разделителна линия между обекти с припокриващи се очертания. Този алгоритъм

функционира добре само, ако са зададени бинарни изображения, съдържащи солидни (без „дупки“) обекти. Очертанията на получените обекти, отграничени от всички страни с нулеви (черни) пиксели могат успешно да бъдат идентифицирани чрез „analyze particles“ операцията в ImageJ, при което бива генериран резултат със списък с очертания на ROI.

За да бъдат избегнати неточни измервания, следва да бъдат изключени регионите, допиращи периферията на изображението (Фигура 49, горе в средата). Въпросните ROI могат да бъдат наложени като очертания върху фазово-контрастната микрография за последваща визуална оценка за наличие на съвпадение между идентифицираните обекти и отделните клетки. След това, очертанията се използват за измерване на интензитета на пикселите във флуоресцентната микрография, като стойностите на измерванията във всяко очертание се вписват като отделен елемент. За да бъде сведено до минимум изкривяването на резултата от флуоресценцията на разтворения в средата доксорубицин, чрез функцията „хистограма“, се идентифицира стойността на модата по отношение на разпределението на пикселите по интензитет, тъй като фонът е сравнително хомогенен, за разлика от интензитетите на пикселите в очертанията на клетките. Тази

стойност се изважда от съответната средните стойности на измерените интензитети.



Фигура 50. Среден интензитет на флуоресценция на L5178 MDR1 клетки след третиране с 50 μM доксорубицин (dox) или 50 μM доксорубицин и 10 nM тариквидар (dox + trq) за 1 h, 2 h или 4 h.

Резултатите от така проведения анализ са представени на Фигура 50. Видно е, че с увеличаване на времето за третиране, количеството на флуоресциращата субстанцията (dox) в клетките се увеличава, а приложението на инхибитор на ефлуксната помпа P-гликопротеин (trq) потиска процеса на изпомпване на субстанцията извън клетката, при което вътреклетъчните концентрации са завишени в сравнение с групата, при която не е приложен подобен инхибитор.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биологичните процеси са компартментализирани на всяко едно ниво, а изображенията са контейнери на информация, които по непосредствен и цялостен начин отразяват това и предоставят възможност за вникване в различни перспективи като време и пространство.

В лабораториите за клетъчно култивиране рутинно се използва светлинна микроскопия и безпристрастното охарактеризиране, документиране и обработка на визуалната информация, събрана в хода на експериментите, би подсилило убедителността на иначе традиционно субективните заключения, базирани на микрографски наблюдения с „просто око“, както и заключенията от методи, при които е трудно да се определи дали резултатът бива изкривен от определени експериментални фактори.

Интересът към анализа на изображения, възникнал през 60-те години на 20 век напоследък рязко се увеличи с навлизането на дълбоките невронни мрежи като U-net. Това даде тласък за развитието на направления като дигиталната патология и високопроизводителните анализи за класифициране и охарактеризиране на обекти в изображенията. Големите езикови модели установяват нови тенденции с предпоставките за демократизация на управлението на софтуера чрез текстови команди и автоматизацията на анализите както в сферата на токсикологията, така и по-общо, в биомедицинската сфера.

В настоящия момент анализите на биоизображения са по-достъпни от когато и да било, тъй като общностите на анализаторите на биоизображения в европейски и световен мащаб са обединили сили, за да създадат условия за

взаимопомощ и развитие на направлението. Познаването на тези възможности е предпоставка за разширяване на методологичния инструментариум на изследователите, провеждащи неклинични изпитвания.

КНИГОПИС

1. COBA (The Center for Open Bioimage Analysis). *https://openbioimageanalysis.org/* https://openbioimageanalysis.org/.
2. NEUBIAS: Network of European BioImage Analysts - NEUBIAS: Network of BioImage Analysts. https://eubias.org/NEUBIAS/.
3. Rempfler, M. *et al.* Tracing cell lineages in videos of lens-free microscopy. *Med. Image Anal.* **48**, 147–161 (2018).
4. Ma, L. *et al.* Metabolomics and mass spectrometry imaging reveal the chronic toxicity of indoxacarb to adult zebrafish (Danio rerio) livers. *J. Hazard. Mater.* **453**, 131304 (2023).
5. Smith, A. R. A Pixel Is Not A Little Square, A Pixel Is Not A Little Square, A Pixel Is Not A Little Square! *Microsoft Comput. Graph. Tech. Memo* **6**, (1995).
6. Eliceiri, K. W., Rueden, C., Mohler, W. A., Hibbard, W. L. & White, J. G. Analysis of Multidimensional Biological Image Data. *BioTechniques* **33**, 1268–1273 (2002).
7. Viljoen, A. *et al.* Force spectroscopy of single cells using atomic force microscopy. *Nat. Rev. Methods Primer* **1**, 1–24 (2021).
8. Bergenstråhle, J., Larsson, L. & Lundeberg, J. Seamless integration of image and molecular analysis for spatial transcriptomics workflows. *BMC Genomics* **21**, 482 (2020).
9. Dries, R. *et al.* Advances in spatial transcriptomic data analysis. *Genome Res.* **31**, 1706–1718 (2021).
10. Benoit, A., Caplier, A., Durette, B. & Herault, J. Using Human Visual System modeling for bio-inspired low level image processing. *Comput. Vis. Image Underst.* **114**, 758–773 (2010).
11. Roberts, B., Harris, M. G. & Yates, T. A. The roles of inducer size and distance in the Ebbinghaus illusion (Titchener circles). *Perception* **34**, 847–856 (2005).
12. Renier, L. *et al.* The Ponzo illusion with auditory substitution of vision in sighted and early-blind subjects. *Perception* **34**, 857–867 (2005).
13. Troscianko, J. & Osorio, D. A model of colour appearance based on efficient coding of natural images. *PLOS Comput. Biol.* **19**, e1011117 (2023).
14. Szeliski, R. *Computer Vision: Algorithms and Applications*. (Springer Nature, 2022).
15. Burger, W. & Burge, M. J. *Digital Image Processing: An Algorithmic Introduction*. (Springer Nature, 2022).
16. Bankhead, P. *Introduction to Bioimage Analysis*. (2023).
17. Miura, K. & Sladoje, N. *Bioimage Data Analysis Workflows*. (Springer Nature, 2019).
18. MinnaLearn & University of Helsinki. Elements of AI course: Introduction to AI. (2018).
19. Пенчо Г. Венков. *Анализ и Разпознаване На Изображения и Сцени*. (ТУ София, 1996).
20. Милан П. Петров, Иван Г. Димитров, & Димитър Н. Балтаджиев. *Въведение в Компютърната Обработка На Медицински Изображения*. (Унив. изд. Св. Климент Охридски;София, 1998).
21. Огнян И. Железов & Лъчезар М. Георгиев. *Компютърна Обработка На Сигнали и Изображения*. (ТУ Варна, 1999).
22. Борислав Маринов. *Цифрова Обработка На Изображения*. (УАСГ, 2014).
23. Чавез, К. & Фокнър, А. *Adobe Photoshop CC: Официален Курс На Adobe Systems*. (Алекс Софт, 2022).
24. Йосифов, Т. *Астрофотография с Цифров Фотоапарат*. (2012).

25. Гълъбов, М. *Съвременни Технологии За Обработка и Визуализация На 3D Изображения*. (2014). doi:10.13140/RG.2.1.2317.8088.
26. Гълъбов, М. *Въведение в Компютърното Зрение*. (2015). doi:10.13140/RG.2.1.2168.3043.
27. Петрова, Т. *Изследване и Синтез На Алгоритми За Обработка На Радиолокационни и Оптични Изображения с Повишено Качество (Study and Synthesis of Algorithms for Aerial and Radar Image Processing with Enhanced Quality)*. (2019).
28. Оджаков, Ф. *Методи За Определяне На Дентална Възраст - От Традицията Към Изкуствения Интелект : Монография*. (София : [Симолини 94], 2023).
29. А. Христов, М. Нишева, & Д. Димов. Въведение в конволюционните невронни мрежи. *Автоматика И Информатика* 27–38 (2018).
30. Момчил Панайотов, Велислава Шишкова, & Александър Вътов. Датиране на икони чрез анализ на изображения на дървени елементи заснети с цифров фотоапарат. *АРХЕОМЕТРИЯ Archaeom.* **9**, 213–227 (2019).
31. Борислав Маринов. Приложение на цифровата обработка на изображения за автоматизиране на технологични процеси във фотограметрията. (УАСГ, 1999).
32. Георги К. Петров. Многомерна цифрова обработка и анализ на последователности от изображения. (2008).
33. Иванова, К. Нов метод за анализ на съдържанието на изображения от картинни колекции, използващ семантиката на цветовете. (2011).
34. Иванчо Т. Кънев. FPGA – базирани линейни пространствени филтри. (2017).
35. Антония Д. Михайлова. Алгоритми за автоматизирано сегментиране при голям брой медицински изображения. (Технически университет - София, 2018).
36. Gonzalez, R. C., Woods, R. E. & Eddins, S. L. *Digital Image Processing Using MATLAB, 2nd Ed. by Rafael C. Gonzalez*. (Gatesmark Publishing, S.I., 2009).
37. Serra, J. & Soille, P. *Mathematical Morphology and Its Applications to Image Processing*. (Springer Science & Business Media, 2012).
38. Chaki, J. & Dey, N. *A Beginner's Guide to Image Preprocessing Techniques*. (CRC Press, 2018).
39. Chaki, J. & Dey, N. *A Beginner's Guide to Image Shape Feature Extraction Techniques*. (CRC Press, 2019).
40. Zhang, Y.-J. *A Selection of Image Analysis Techniques: From Fundamental to Research Front*. (CRC Press, 2022).
41. Frery, A. C., Wu, J. & Gomez, L. *SAR Image Analysis - A Computational Statistics Approach: With R Code, Data, and Applications*. (Wiley, 2022).
42. Vollmer, S. *et al.* Online learning Tool for Research Integrity and image processing. https://ori.hhs.gov/education/products/RIandImages/default.html (2008).
43. Paulsen, R. R. & Moeslund, T. B. *Introduction to Medical Image Analysis*. (Springer Nature, 2020).
44. Koundal, D. & Gupta, S. *Advances in Computational Techniques for Biomedical Image Analysis: Methods and Applications*. (Elsevier Science, 2020).
45. Chen, M. *Computer Vision for Microscopy Image Analysis*. (Academic Press, 2020).
46. Pawley, J. B. Points, Pixels, and Gray Levels: Digitizing Image Data. in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (ed. Pawley, J. B.) 59–79 (Springer US, Boston, MA, 2006). doi:10.1007/978-0-387-45524-2_4.
47. Shannon, C. E. Communication in the Presence of Noise. *Proc. IRE* **37**, 10–21 (1949).
48. Nyquist, H. Certain Topics in Telegraph Transmission Theory. *Trans. Am. Inst. Electr. Eng.* **47**, 617–644 (1928).
49. Whittaker, E. T. XVIII.—On the Functions which are represented by the Expansions of the Interpolation-Theory. *Proc. R. Soc. Edinb.* **35**, 181–194 (1915).
50. Nyquist Conditions. https://imb.uq.edu.au/research/facilities/microscopy/training-manuals/microscopy-online-resources/image-capture/nyquist-conditions (2020).

51. Pawley, J. Handbook of biological confocal microscopy. (2006).
52. Por, E., van Kooten, M. & Sarkovic, V. Nyquist–Shannon sampling theorem. *Leiden Univ.* **1**, (2019).
53. Jaques, C. & Liebling, M. Aliasing mitigation in optical microscopy of dynamic biological samples by use of temporally modulated color illumination and a standard RGB camera. *J. Biomed. Opt.* **25**, (2020).
54. Sellaro, T. L. *et al.* Relationship between magnification and resolution in digital pathology systems. *J. Pathol. Inform.* **4**, 21 (2013).
55. Heilemann, M. Fluorescence microscopy beyond the diffraction limit. *J. Biotechnol.* **149**, 243–251 (2010).
56. Zhang, B., Zerubia, J. & Olivo-Marin, J.-C. Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models. *Appl. Opt.* **46**, 1819–1829 (2007).
57. Wiklund, M., Brismar, H. & Önfelt, B. Acoustofluidics 18: Microscopy for acoustofluidic micro-devices. *Lab. Chip* **12**, 3221–34 (2012).
58. Department, D. C. P. & OpenStax. 12.6 Limits of Resolution: The Rayleigh Criterion. (2016).
59. Rayleigh Length (Range) Calculator. https://www.gophotonics.com/calculators/rayleigh-length-range-calculator.
60. Rivera-Ortega, U. & Pico-Gonzalez, B. Wavelength estimation by using the Airy disk from a diffraction pattern with didactic purposes. *Phys. Educ.* **51**, 015012 (2015).
61. Demmerle, J., Wegel, E., Schermelleh, L. & Dobbie, I. M. Assessing resolution in super-resolution imaging. *Methods* **88**, 3–10 (2015).
62. Resolution. *Nikon's MicroscopyU* https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/resolution.
63. Ross, S. T., Allen, J. R. & Davidson, M. W. Chapter 2 - Practical considerations of objective lenses for application in cell biology. in *Methods in Cell Biology* (eds. Waters, J. C. & Wittman, T.) vol. 123 19–34 (Academic Press, 2014).
64. idan. How oil immersion objectives can improve your microscopy? *IDEA Bio-Medical* http://idea-bio.com/how-oil-immersion-objectives-can-improve-your-microscopy/ (2021).
65. Ram, S., Ward, E. S. & Ober, R. J. Beyond Rayleigh's criterion: A resolution measure with application to single-molecule microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 4457–4462 (2006).
66. Jonkman, J., Brown, C. M., Wright, G. D., Anderson, K. I. & North, A. J. Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. *Nat. Protoc.* **15**, 1585–1611 (2020).
67. Elliott, A. D. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr. Protoc. Cytom.* **92**, e68 (2020).
68. White, J. G., Squirrell, J. M. & Eliceiri, K. W. Applying Multiphoton Imaging to the Study of Membrane Dynamics in Living Cells. *Traffic Cph. Den.* **2**, 775–780 (2001).
69. Lanni, F., Waggoner, A. S. & Taylor, D. L. Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* **100**, 1091–1102 (1985).
70. Fish, K. N. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Curr. Protoc. Cytom. Editor. Board J Paul Robinson Manag. Ed. Al* **0 12**, Unit12.18 (2009).
71. Liu, C. *et al.* Super-resolution nanoscopy by coherent control on nanoparticle emission. *Sci. Adv.* **6**, eaaw6579 (2020).
72. Hein, B., Willig, K. I. & Hell, S. W. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 14271–14276 (2008).
73. Yeh, L.-H., Tian, L. & Waller, L. Structured illumination microscopy with unknown patterns and a statistical prior. *Biomed. Opt. Express* **8**, 695–711 (2017).
74. Shroff, H., White, H. & Betzig, E. Photoactivated Localization Microscopy (PALM) of Adhesion Complexes. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **58**, 4.21.1-4.21.28 (2013).

75. Xu, J., Ma, H. & Liu, Y. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Curr. Protoc. Cytom.* **81**, 12.46.1-12.46.27 (2017).
76. Kuang, C. *et al.* Breaking the Diffraction Barrier Using Fluorescence Emission Difference Microscopy. *Sci. Rep.* **3**, 1441 (2013).
77. Kang, M.-S. *et al.* Accuracy improvement of quantification information using super-resolution with convolutional neural network for microscopy images. *Biomed. Signal Process. Control* **58**, 101846 (2020).
78. Wang, Z., Chen, J. & Hoi, S. C. H. Deep Learning for Image Super-resolution: A Survey. Preprint at http://arxiv.org/abs/1902.06068 (2020).
79. Digital Imaging Tutorial - Basic Terminology. *Cornell University Library/ Research Department* http://preservationtutorial.library.cornell.edu/tutorial/ (2000).
80. Rodríguez-Sevilla, P., Thompson, S. A. & Jaque, D. Multichannel Fluorescence Microscopy: Advantages of Going beyond a Single Emission. *Adv. NanoBiomed Res.* **2**, 2100084 (2022).
81. Qi, G. *et al.* Nucleus and Mitochondria Targeting Theranostic Plasmonic SERS Nanoprobes Reveal Molecular Stress Response Difference in Hyperthermia Cell Death between Cancerous and Normal Cells. *Anal. Chem.* **90**, (2018).
82. Basu, S. S. *et al.* Rapid MALDI mass spectrometry imaging for surgical pathology. *Npj Precis. Oncol.* **3**, 1–5 (2019).
83. Lagache, T., Sauvonnet, N., Danglot, L. & Olivo-Marin, J.-C. Statistical analysis of molecule colocalization in bioimaging. *Cytometry A* **87**, 568–579 (2015).
84. Aron, M. *et al.* Spectral imaging toolbox: segmentation, hyperstack reconstruction, and *batch* processing of spectral images for the determination of cell and model membrane lipid order. *BMC Bioinformatics* **18**, 254 (2017).
85. Wang, F., Oh, T. W., Vergara-Niedermayr, C., Kurc, T. & Saltz, J. Managing and Querying Whole Slide Images. *Proc. SPIE* **8319**, 83190J (2012).
86. Farahani, N., Parwani, A. V. & Pantanowitz, L. Whole slide imaging in pathology: advantages, limitations, and emerging perspectives. *Pathol. Lab. Med. Int.* **7**, 23–33 (2015).
87. Antonelli, L., Guarracino, M. R., Maddalena, L. & Sangiovanni, M. Integrating imaging and omics data: A review. *Biomed. Signal Process. Control* **52**, 264–280 (2019).
88. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
89. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
90. Seibert, J. A., Boone, J. M. & Lindfors, K. K. Flat-field correction technique for digital detectors. in (eds. Dobbins Iii, J. T. & Boone, J. M.) 348 (San Diego, CA, 1998). doi:10.1117/12.317034.
91. Ibraheem, N. A., Hasan, M. M., Khan, R. Z. & Mishra, P. K. Understanding Color Models: A Review. **2**, (2012).
92. Standard RGB Color Spaces. *Proc ISTSID 7th Color Imaging Conf.* (1999).
93. HTML Color Codes. *HTML Color Codes* https://htmlcolorcodes.com/.
94. Harrower, M. & Brewer, C. A. ColorBrewer.org: An Online Tool for Selecting Colour Schemes for Maps. *Cartogr. J.* **40**, 27–37 (2003).
95. Püspöki, Z., Storath, M., Sage, D. & Unser, M. Transforms and Operators for Directional Bioimage Analysis: A Survey. in *Focus on Bio-Image Informatics* (eds. De Vos, W. H., Munck, S. & Timmermans, J.-P.) vol. 219 69–93 (Springer International Publishing, Cham, 2016).
96. Foot, N. C. The Masson Trichrome Staining Methods in Routine Laboratory Use. *Stain Technol.* **8**, 101–110 (1933).
97. Glasbey, C., van der Heijden, G., Toh, V. F. K. & Gray, A. Colour displays for categorical images. *Color Res. Appl.* **32**, 304–309 (2007).

98. Landini, G., Martinelli, G. & Piccinini, F. Colour deconvolution: stain unmixing in histological imaging. *Bioinformatics* **37**, 1485–1487 (2021).
99. Ruifrok, A. & Johnston, D. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. Anal Quant Cytol Histol 23: 291-299. *Anal. Quant. Cytol. Histol. Int. Acad. Cytol. Am. Soc. Cytol.* **23**, 291–9 (2001).
100. Bankhead, P. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* **7**, 16878 (2017).
101. Linkert, M. *et al.* Metadata matters: access to image data in the real world. *J. Cell Biol.* **189**, 777–782 (2010).
102. Bio-formats. https://www.openmicroscopy.org/bio-formats/.
103. Vorkel, D. & Haase, R. GPU-Accelerating ImageJ Macro Image Processing Workflows Using CLIJ. in *Bioimage Data Analysis Workflows – Advanced Components and Methods* (eds. Miura, K. & Sladoje, N.) 89–114 (Springer International Publishing, Cham, 2022). doi:10.1007/978-3-030-76394-7_5.
104. Ettinger, A. & Wittmann, T. Fluorescence Live Cell Imaging. *Methods Cell Biol.* **123**, 77–94 (2014).
105. Model, M. Intensity Calibration and Flat-Field Correction for Fluorescence Microscopes. *Curr. Protoc. Cytom.* **68**, (2014).
106. Wang, Q., Niemi, J., Tan, C.-M., You, L. & West, M. Image segmentation and dynamic lineage analysis in single-cell fluorescence microscopy. *Cytometry A* **77A**, 101–110 (2010).
107. Coste, A. CS6640: Image Processing Project 2 Filtering, Edge detection and Template matching. in (2012).
108. Cromey, D. W. Avoiding Twisted Pixels: Ethical Guidelines for the Appropriate Use and Manipulation of Scientific Digital Images. *Sci. Eng. Ethics* **16**, 639–667 (2010).
109. Kafadar, Ö. Applications of the Kuwahara and Gaussian filters on potential field data. *J. Appl. Geophys.* **198**, 104583 (2022).
110. Engel, W. *GPU Pro: Advanced Rendering Techniques*. (CRC Press, 2010).
111. Kyprianidis, J. E., Semmo, A., Kang, H. & Döllner, J. Anisotropic Kuwahara Filtering with Polynomial Weighting Functions. (2010).
112. Lucas, A. M. *et al.* Open-source deep-learning software for bioimage segmentation. *Mol. Biol. Cell* **32**, 823–829 (2021).
113. Russ, J. C. *The Image Processing Handbook*. (CRC Press, Boca Raton, 2006). doi:10.1201/9780203881095.
114. John McCarthy, Marvin L. Minsky, Nathaniel Rochester, & Claude E. Shannon. A Proposal for the Dartmouth Summer Research Project on Artificial Intelligence. (1955).
115. Legg, S. & Hutter, M. A Collection of Definitions of Intelligence. Preprint at http://arxiv.org/abs/0706.3639 (2007).
116. Sheikh, H., Prins, C. & Schrijvers, E. Artificial Intelligence: Definition and Background. in *Mission AI: The New System Technology* (eds. Sheikh, H., Prins, C. & Schrijvers, E.) 15–41 (Springer International Publishing, Cham, 2023). doi:10.1007/978-3-031-21448-6_2.
117. Fjelland, R. Why general artificial intelligence will not be realized. *Humanit. Soc. Sci. Commun.* **7**, 1–9 (2020).
118. Bini, S. A. Artificial Intelligence, Machine Learning, Deep Learning, and Cognitive Computing: What Do These Terms Mean and How Will They Impact Health Care? *J. Arthroplasty* **33**, 2358–2361 (2018).
119. Jordan, M. I. & Mitchell, T. M. Machine learning: Trends, perspectives, and prospects. *Science* **349**, 255–260 (2015).
120. Greener, J. G., Kandathil, S. M., Moffat, L. & Jones, D. T. A guide to machine learning for biologists. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 40–55 (2022).

121. Badillo, S. *et al.* An Introduction to Machine Learning. *Clin. Pharmacol. Ther.* **107**, 871–885 (2020).
122. Montesinos López, O. A., Montesinos López, A. & Crossa, J. Fundamentals of Artificial Neural Networks and Deep Learning. in *Multivariate Statistical Machine Learning Methods for Genomic Prediction* (eds. Montesinos López, O. A., Montesinos López, A. & Crossa, J.) 379–425 (Springer International Publishing, Cham, 2022). doi:10.1007/978-3-030-89010-0_10.
123. Deep Learning in a Nutshell: Core Concepts. *NVIDIA Technical Blog* https://developer.nvidia.com/blog/deep-learning-nutshell-core-concepts/ (2015).
124. Suzuki, K. Overview of deep learning in medical imaging. *Radiol. Phys. Technol.* **10**, 257–273 (2017).
125. Milletari, F., Navab, N. & Ahmadi, S.-A. V-Net: Fully Convolutional Neural Networks for Volumetric Medical Image Segmentation. Preprint at https://doi.org/10.48550/arXiv.1606.04797 (2016).
126. Ronneberger, O., Fischer, P. & Brox, T. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. in *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015* (eds. Navab, N., Hornegger, J., Wells, W. M. & Frangi, A. F.) 234–241 (Springer International Publishing, Cham, 2015). doi:10.1007/978-3-319-24574-4_28.
127. Fukushima, K. Neocognitron: A self-organizing neural network model for a mechanism of pattern recognition unaffected by shift in position. *Biol. Cybern.* **36**, 193–202 (1980).
128. Gyawali, D. Comparative Analysis of CPU and GPU Profiling for Deep Learning Models. Preprint at http://arxiv.org/abs/2309.02521 (2023).
129. Machine Learning Service - Amazon SageMaker - AWS. https://aws.amazon.com/sagemaker/.
130. Google Colaboratory. https://colab.research.google.com/.
131. Kaggle: Your Machine Learning and Data Science Community. https://www.kaggle.com/.
132. LeCun, Y., Bengio, Y. & Hinton, G. Deep learning. *Nature* **521**, 436–444 (2015).
133. Uhlmann, V., Donati, L. & Sage, D. A Practical Guide to Supervised Deep Learning for Bioimage Analysis: Challenges and good practices. *IEEE Signal Process. Mag.* **39**, 73–86 (2022).
134. Gunning, D., Vorm, E., Wang, J. Y. & Turek, M. DARPA's explainable AI (XAI) program: A retrospective. *Appl. AI Lett.* **2**, e61 (2021).
135. van der Velden, B. H. M., Kuijf, H. J., Gilhuijs, K. G. A. & Viergever, M. A. Explainable artificial intelligence (XAI) in deep learning-based medical image analysis. *Med. Image Anal.* **79**, 102470 (2022).
136. Exploring the Web of Science Core Collection | Sciendo. https://sciendo.com/blog/exploring-the-web-of-science-core-collection (2023).
137. Verwer, Groen, Ekkers, & Ellens. Image processing on personal computers. in *IEEE International Conference on Systems Engineering* 183–186 (IEEE, Fairborn, OH, USA, 1989). doi:10.1109/ICSYSE.1989.48650.
138. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 1–12 (2016).
139. Prado, C. M. *et al.* Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *Lancet Oncol.* **9**, 629–635 (2008).
140. Bhatia, S. N. & Ingber, D. E. Microfluidic organs-on-chips. *Nat. Biotechnol.* **32**, 760–772 (2014).
141. Pampaloni, F., Reynaud, E. G. & Stelzer, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 839–845 (2007).
142. O'Rourke, D. M. *et al.* A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaaa0984 (2017).
143. Kim, P. *MATLAB Deep Learning*. (Apress, Berkeley, CA, 2017). doi:10.1007/978-1-4842-2845-6.

144. Schroeder, A. B. *et al.* The ImageJ ecosystem: Open-source software for image visualization, processing, and analysis. *Protein Sci.* **30**, 234–249 (2021).
145. Core Team, R. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. *Vienna Austria URL Httpswww R-Proj. OrgGoogle Sch.* (2021).
146. RStudio Team. *RStudio: Integrated Development Environment for R*. (RStudio, PBC., Boston, MA, 2021).
147. Aria, M. & Cuccurullo, C. bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. *J. Informetr.* **11**, 959–975 (2017).
148. Asanovic, K. *et al. The Parallel Computing Laboratory at U.C. Berkeley: A Research Agenda Based on the Berkeley View*. (2008).
149. Schindler, D., Bensmann, F., Dietze, S. & Krüger, F. The role of software in science: a knowledge graph-based analysis of software mentions in PubMed Central. *PeerJ Comput. Sci.* **8**, e835 (2022).
150. Long, R. E. *et al.* Scientific and Regulatory Policy Committee (SRPC) Paper: Validation of Digital Pathology Systems in the Regulated Nonclinical Environment. *Toxicol. Pathol.* **41**, 115–124 (2013).
151. Paul-Gilloteaux, P. Bioimage informatics: Investing in software usability is essential. *PLOS Biol.* **21**, e3002213 (2023).
152. Chlipala, E. A. *et al.* Impact of Preanalytical Factors During Histology Processing on Section Suitability for Digital Image Analysis. *Toxicol. Pathol.* **49**, 755–772 (2021).
153. Hayes, T. R. *et al.* Biological Distribution and Metabolic Profiles of Carbon-11 and Fluorine-18 Tracers of VX- and Sarin-Analogs in Sprague–Dawley Rats. *Chem. Res. Toxicol.* **34**, 63–69 (2021).
154. Basu, A., Dydowiczová, A., Trosko, J. E., Bláha, L. & Babica, P. Ready to go 3D? A semi-automated protocol for microwell spheroid arrays to increase scalability and throughput of 3D cell culture testing. *Toxicol. Mech. Methods* **30**, 590–604 (2020).
155. Adomshick, V., Pu, Y. & Veiga-Lopez, A. Automated Lipid Droplet Quantification System for Phenotypic Analysis of Adipocytes using CellProfiler. *Toxicol. Mech. Methods* **30**, 378–387 (2020).
156. Nault, R., Colbry, D., Brandenberger, C., Harkema, J. R. & Zacharewski, T. R. Development of a Computational High-Throughput Tool for the Quantitative Examination of Dose-Dependent Histological Features. *Toxicol. Pathol.* **43**, 366–375 (2015).
157. McCollum, C. W. *et al.* Identification of vascular disruptor compounds by analysis in zebrafish embryos and mouse embryonic endothelial cells. *Reprod. Toxicol.* **70**, 60–69 (2017).
158. Nyska, A. *et al.* Electron Microscopy of Wet Tissues: A Case Study in Renal Pathology. *Toxicol. Pathol.* **32**, 357–363 (2004).
159. He, K., Zhang, X., Ren, S. & Sun, J. Deep Residual Learning for Image Recognition. in *2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)* 770–778 (IEEE, Las Vegas, NV, USA, 2016). doi:10.1109/CVPR.2016.90.
160. Jia, Y. *et al.* Caffe: Convolutional Architecture for Fast Feature Embedding. *arXiv.org* https://arxiv.org/abs/1408.5093v1 (2014).
161. Kingma, D. P. & Ba, J. Adam: A Method for Stochastic Optimization. *arXiv.org* https://arxiv.org/abs/1412.6980v9 (2014).
162. Nilsson, A. *et al.* Investigating Nephrotoxicity of Polymyxin Derivatives by Mapping Renal Distribution Using Mass Spectrometry Imaging. *Chem. Res. Toxicol.* **28**, 1823–1830 (2015).
163. Andersson, M., Karlsson, O. & Brandt, I. The environmental neurotoxin β-N-methylamino-l-alanine (l-BMAA) is deposited into birds' eggs. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **147**, 720–724 (2018).
164. Danielsson, B. R., Sköld, A.-C., Johansson, A., Dillner, B. & Blomgren, B. Teratogenicity by the hERG potassium channel blocking drug almokalant: use of hypoxia marker gives evidence for a

hypoxia-related mechanism mediated via embryonic arrhythmia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **193**, 168–176 (2003).
165. Ostling, O. & Johanson, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291–298 (1984).
166. Hinojosa, M. G. *et al.* Evaluation of mRNA markers in differentiating human SH-SY5Y cells for estimation of developmental neurotoxicity. *NeuroToxicology* **97**, 65–77 (2023).
167. Hu, C., Hsiao, Z. H., Yin, L. & Yu, X. The role of small GTPases in bisphenol AF-induced multinucleation in comparison with dibutyl phthalate in the male germ cells. *Toxicol. Sci.* **192**, 43–58 (2023).
168. El Hayek, E. *et al.* Photoaging of polystyrene microspheres causes oxidative alterations to surface physicochemistry and enhances airway epithelial toxicity. *Toxicol. Sci.* **193**, 90–102 (2023).
169. Ibabe, A., Herrero, A. & Cajaraville, M. P. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by PPARα- and PPARγ-specific ligands and by 17β-estradiol in isolated zebrafish hepatocytes. *Toxicol. Ин витро* **19**, 725–735 (2005).
170. Marigómez, I., Izagirre, U. & Lekube, X. Lysosomal enlargement in digestive cells of mussels exposed to cadmium, benzo[a]pyrene and their combination. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* **141**, 188–193 (2005).
171. Alvarez-Mora, I. *et al.* SETApp: A machine learning and image analysis based application to automate the sea urchin embryo test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **241**, 113728 (2022).
172. Frieauff, W., Pötter-Locher, F., Cordier, A. & Suter, W. Automatic analysis of the *ин витро* micronucleus test on V79 cells. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **413**, 57–68 (1998).
173. Frieauff, W., Hartmann, A. & Suter, W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis* **16**, 133–137 (2001).
174. Das, K. P., Freudenrich, T. M. & Mundy, W. R. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicol. Teratol.* **26**, 397–406 (2004).
175. Teixidó, E. *et al.* Automated Morphological Feature Assessment for Zebrafish Embryo Developmental Toxicity Screens. *Toxicol. Sci.* **167**, 438–449 (2019).
176. Scholz, S. *et al.* Analysis of estrogenic effects by quantification of green fluorescent protein in juvenile fish of a transgenic medaka. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 2553–2561 (2005).
177. Lee, J., Escher, B. I., Scholz, S. & Schlichting, R. Inhibition of neurite outgrowth and enhanced effects compared to baseline toxicity in SH-SY5Y cells. *Arch. Toxicol.* **96**, 1039–1053 (2022).
178. Fischer, F. C. *et al.* Cellular Uptake Kinetics of Neutral and Charged Chemicals in *ин витро* Assays Measured by Fluorescence Microscopy. *Chem. Res. Toxicol.* **31**, 646–657 (2018).
179. Teixidó, E., Kieβling, T. R., Klüver, N. & Scholz, S. Grouping of chemicals into mode of action classes by automated effect pattern analysis using the zebrafish embryo toxicity test. *Arch. Toxicol.* **96**, 1353–1369 (2022).
180. Forchhammer, L. *et al.* Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG† inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis* **25**, 113–123 (2010).
181. Azqueta, A. *et al.* The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. *Mutagenesis* **26**, 393–399 (2011).
182. Møller, P. *et al.* Visual comet scoring revisited: a guide to scoring comet assay slides and obtaining reliable results. *Mutagenesis* **38**, 253–263 (2023).
183. Potier, M., Lakhdar, B., L'azou, B. & Cambar, J. Inhibition of cyclosporin-induced *ин витро* glomerular contraction by theophylline. *Toxicol. Ин витро* **9**, 473–476 (1995).
184. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184–191 (1988).

185. Tice, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: Guidelines for *ин витро* and *ин виво* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206–221 (2000).
186. Fairbairn, D. W., Olive, P. L. & O'Neill, K. L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **339**, 37–59 (1995).
187. Olive, P. L., Banáth, J. P. & Durand, R. E. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the 'Comet' Assay. *Radiat. Res.* **122**, 86–94 (1990).
188. Collins, A. R., Ai-guo, M. & Duthie, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res. Repair* **336**, 69–77 (1995).
189. Jaggi, B., Poon, S. S. S., Macaulay, C. & Palcic, B. Imaging system for morphometric assessment of absorption or fluorescence in stained cells. *Cytometry* **9**, 566–572 (1988).
190. McKelvey-Martin, V. J. *et al.* The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.* **288**, 47–63 (1993).
191. Maron, D. M. & Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* **113**, 173–215 (1983).
192. Collins, A. R., Cadet, J., Mőller, L., Poulsen, H. E. & Viña, J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch. Biochem. Biophys.* **423**, 57–65 (2004).
193. Lowe, D. M., Moore, M. N. & Clarke, K. R. Effects of oil on digestive cells in mussels: Quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquat. Toxicol.* **1**, 213–226 (1981).
194. Moore, M. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **46**, 81–89 (1988).
195. Etxeberria, M., Sastre, I., Cajaraville, M. P. & Marig mez, I. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd, and Zn) in mussels collected from a zinc-polluted site. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **27**, (1994).
196. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
197. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
198. Romagna, F. & Staniforth, C. D. The automated bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **213**, 91–104 (1989).
199. Frieauff, W. & Romagna, F. Technical aspects of automatic micronucleus analysis in rodent bone marrow assays. *Cell Biol. Toxicol.* **10**, 283–289 (1994).
200. Fenech, M. The *ин витро* micronucleus technique. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **455**, 81–95 (2000).
201. Fenech, M. *et al.* HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* **534**, 65–75 (2003).
202. Diaz, D., Scott, A., Carmichael, P., Shi, W. & Costales, C. Evaluation of an automated *ин витро* micronucleus assay in CHO-K1 cells. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **630**, 1–13 (2007).
203. Decordier, I. *et al.* Automated image analysis of cytokinesis-blocked micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring. *Mutagenesis* **24**, 85–93 (2009).
204. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
205. Aeffner, F. *et al.* Commentary: Roles for Pathologists in a High-throughput Image Analysis Team. *Toxicol. Pathol.* **44**, 825–834 (2016).

206. Aeffner, F. *et al.* The Gold Standard Paradox in Digital Image Analysis: Manual Versus Automated Scoring as Ground Truth. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **141**, 1267–1275 (2017).
207. Grandjean, P., Harari, R., Barr, D. B. & Debes, F. Pesticide exposure and stunting as independent predictors of neurobehavioral deficits in Ecuadorian school children. *Pediatrics* **117**, e546-556 (2006).
208. Moors, M. *et al.* Human Neurospheres as Three-Dimensional Cellular Systems for Developmental Neurotoxicity Testing. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1131–1138 (2009).
209. Siddique, N., Paheding, S., Elkin, C. P. & Devabhaktuni, V. U-Net and Its Variants for Medical Image Segmentation: A Review of Theory and Applications. *IEEE Access* **9**, 82031–82057 (2021).
210. Gauthier, B. E. *et al.* Toxicologic Pathology Forum*: Opinion on Integrating Innovative Digital Pathology Tools in the Regulatory Framework. *Toxicol. Pathol.* **47**, 436–443 (2019).
211. Kuklyte, J. *et al.* Evaluation of the Use of Single- and Multi-Magnification Convolutional Neural Networks for the Determination and Quantitation of Lesions in Nonclinical Pathology Studies. *Toxicol. Pathol.* **49**, 815–842 (2021).
212. Pischon, H. *et al.* Artificial Intelligence in Toxicologic Pathology: Quantitative Evaluation of Compound-Induced Hepatocellular Hypertrophy in Rats. *Toxicol. Pathol.* **49**, 928–937 (2021).
213. Schumacher, V. L. *et al.* The Application, Challenges, and Advancement Toward Regulatory Acceptance of Digital Toxicologic Pathology: Results of the 7th ESTP International Expert Workshop (September 20-21, 2019). *Toxicol. Pathol.* **49**, 720–737 (2021).
214. Saravanan, C. *et al.* Meeting Report: Tissue-based Image Analysis. *Toxicol. Pathol.* **45**, 983–1003 (2017).
215. Lindauer, K., Bartels, T., Scherer, P. & Kabiri, M. Development and Validation of an Image Analysis System for the Measurement of Cell Proliferation in Mammary Glands of Rats. *Toxicol. Pathol.* **47**, 634–644 (2019).
216. Yin, L. *et al.* High-Content Image-Based Single-Cell Phenotypic Analysis for the Testicular Toxicity Prediction Induced by Bisphenol A and Its Analogs Bisphenol S, Bisphenol AF, and Tetrabromobisphenol A in a Three-Dimensional Testicular Cell Co-culture Model. *Toxicol. Sci.* **173**, 313–335 (2020).
217. O'Brien, P. J. *et al.* High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with *ин витро* cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch. Toxicol.* **80**, 580–604 (2006).
218. Harrill, J. A., Freudenrich, T. M., Machacek, D. W., Stice, S. L. & Mundy, W. R. Quantitative assessment of neurite outgrowth in human embryonic stem cell-derived hN2™ cells using automated high-content image analysis. *NeuroToxicology* **31**, 277–290 (2010).
219. Verma, J. R. *et al.* Evaluation of the automated MicroFlow® and Metafer™ platforms for high-throughput micronucleus scoring and dose response analysis in human lymphoblastoid TK6 cells. *Arch. Toxicol.* **91**, 2689–2698 (2017).
220. Pointon, A. *et al.* From the Cover: High-Throughput Imaging of Cardiac Microtissues for the Assessment of Cardiac Contraction during Drug Discovery. *Toxicol. Sci.* **155**, 444–457 (2017).
221. Wink, S., Hiemstra, S., Herpers, B. & van de Water, B. High-content imaging-based BAC-GFP toxicity pathway reporters to assess chemical adversity liabilities. *Arch. Toxicol.* **91**, 1367–1383 (2017).
222. Kozlowski, C., Brumm, J. & Cain, G. An Automated Image Analysis Method to Quantify Veterinary Bone Marrow Cellularity on H&E Sections. *Toxicol. Pathol.* **46**, 324–335 (2018).
223. Ishii, Y. *et al.* Visualization of the distribution of anthraquinone components from madder roots in rat kidneys by desorption electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry imaging. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **161**, 112851 (2022).
224. Asaoka, Y. *et al.* Histopathological image analysis of chemical-induced hepatocellular hypertrophy in mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* **68**, 233–239 (2016).

225. Ramot, Y. *et al.* Microscope-Based Automated Quantification of Liver Fibrosis in Mice Using a Deep Learning Algorithm. *Toxicol. Pathol.* **49**, 1126–1133 (2021).
226. Tokarz, D. A. *et al.* Using Artificial Intelligence to Detect, Classify, and Objectively Score Severity of Rodent Cardiomyopathy. *Toxicol. Pathol.* **49**, 888–896 (2021).
227. Zuraw, A. *et al.* Developing a Qualification and Verification Strategy for Digital Tissue Image Analysis in Toxicological Pathology. *Toxicol. Pathol.* **49**, 773–783 (2021).
228. Srivastava, A. *et al.* Quantitative Neurotoxicology: An Assessment of the Neurotoxic Profile of Kainic Acid in Sprague Dawley Rats. *Int. J. Toxicol.* **39**, 294–306 (2020).
229. Yoshikawa, T. *et al.* Current status of pathological image analysis technology in pharmaceutical companies: a questionnaire survey of the Japan Pharmaceutical Manufacturers Association. *J. Toxicol. Pathol.* **33**, 131–139 (2020).
230. Nolte, T., Kaufmann, W., Schorsch, F., Soames, T. & Weber, E. Standardized assessment of cell proliferation: The approach of the RITA-CEPA working group. *Exp. Toxicol. Pathol.* **57**, 91–103 (2005).
231. Horai, Y. *et al.* Quantification of histopathological findings using a novel image analysis platform. *J. Toxicol. Pathol.* **32**, 319–327 (2019).
232. Petroff, R. *et al.* Chronic, low-level oral exposure to marine toxin, domoic acid, alters whole brain morphometry in nonhuman primates. *NeuroToxicology* **72**, 114–124 (2019).
233. Ramm, S. *et al.* A Systems Toxicology Approach for the Prediction of Kidney Toxicity and Its Mechanisms *Ин витро*. *Toxicol. Sci.* **169**, 54–69 (2019).
234. Kozlowski, C. *et al.* Proof of Concept for an Automated Image Analysis Method to Quantify Rat Bone Marrow Hematopoietic Lineages on H&E Sections. *Toxicol. Pathol.* **46**, 336–347 (2018).
235. Stock, V., Sutter, A., Raschke, M. & Queisser, N. A tripartite mode of action approach for investigating the impact of aneugens on tubulin polymerization. *Environ. Mol. Mutagen.* **59**, 188–201 (2018).
236. Wink, S., Hiemstra, S. W., Huppelschoten, S., Klip, J. E. & van de Water, B. Dynamic imaging of adaptive stress response pathway activation for prediction of drug induced liver injury. *Arch. Toxicol.* **92**, 1797–1814 (2018).
237. Mundy, W. R., Radio, N. M. & Freudenrich, T. M. Neuronal models for evaluation of proliferation *ин витро* using high content screening. *Toxicology* **270**, 121–130 (2010).
238. Lazzari, M., Bettini, S., Milani, L., Maurizii, M. G. & Franceschini, V. Differential response of olfactory sensory neuron populations to copper ion exposure in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* **183**, 54–62 (2017).
239. Zhu, Y.-J. *et al.* Molecular and toxicologic research in newborn hypospadiac male rats following in utero exposure to di-n-butyl phthalate (DBP). *Toxicology* **260**, 120–125 (2009).
240. Bigley, A. L., Klein, S. K., Davies, B., Williams, L. & Rudmann, D. G. Using Automated Image Analysis Algorithms to Distinguish Normal, Aberrant, and Degenerate Mitotic Figures Induced by Eg5 Inhibition. *Toxicol. Pathol.* **44**, 663–672 (2016).
241. Deal, S. *et al.* Development of a quantitative morphological assessment of toxicant-treated zebrafish larvae using brightfield imaging and high-content analysis. *J. Appl. Toxicol. JAT* **36**, 1214–1222 (2016).
242. Garman, R. H., Li, A. A., Kaufmann, W., Auer, R. N. & Bolon, B. Recommended Methods for Brain Processing and Quantitative Analysis in Rodent Developmental Neurotoxicity Studies. *Toxicol. Pathol.* **44**, 14–42 (2016).
243. Bernardi, M. *et al.* Absence of micronucleus formation in CHO-K1 cells cultivated in platelet lysate enriched medium. *Exp. Toxicol. Pathol.* **66**, 111–116 (2014).
244. Hammad, S. *et al.* Protocols for staining of bile canalicular and sinusoidal networks of human, mouse and pig livers, three-dimensional reconstruction and quantification of tissue microarchitecture by image processing and analysis. *Arch. Toxicol.* **88**, 1161–1183 (2014).

245. Machado, M. D. & Soares, E. V. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. *Aquat. Toxicol.* **147**, 1–6 (2014).
246. Nakanishi, T., Nirasawa, T. & Takubo, T. Quantitative Mass Barcode-Like Image of Nicotine in Single Longitudinally Sliced Hair Sections from Long-Term Smokers by Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry Imaging. *J. Anal. Toxicol.* **38**, 349–353 (2014).
247. Axelrad, J. C., Howard, C. V. & McLean, W. G. Interactions between pesticides and components of pesticide formulations in an *ин витро* neurotoxicity test. *Toxicology* **173**, 259–268 (2002).
248. Kiskinis, E., Suter, W. & Hartmann, A. High throughput Comet assay using 96-well plates. *Mutagenesis* **17**, 37–43 (2002).
249. Riecke, K. *et al.* Low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increase transforming growth factor β and cause myocardial fibrosis in marmosets (Callithrix jacchus). *Arch. Toxicol.* **76**, 360–366 (2002).
250. Aung, K. H. *et al.* Inhibition of neurite outgrowth and alteration of cytoskeletal gene expression by sodium arsenite. *NeuroToxicology* **34**, 226–235 (2013).
251. Frieauff, W., Martus, H. J., Suter, W. & Elhajouji, A. Automatic analysis of the micronucleus test in primary human lymphocytes using image analysis. *Mutagenesis* **28**, 15–23 (2013).
252. Hall, A. P., Davies, W., Stamp, K., Clamp, I. & Bigley, A. Comparison of computerized image analysis with traditional semiquantitative scoring of Perls' Prussian Blue stained hepatic iron deposition. *Toxicol. Pathol.* **41**, 992–1000 (2013).
253. Mercer, R. R. *et al.* Distribution and fibrotic response following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 33 (2013).
254. Wakui, S. *et al.* Nuclear Morphometric Analysis of Leydig Cells of Male Pubertal Rats Exposed In Utero to Di(n-butyl) Phthalate. *J. Toxicol. Pathol.* **26**, 439–446 (2013).
255. Wakui, S. *et al.* Retraction: Nuclear Morphometric Analysis of Leydig Cells of Male Pubertal Rats Exposed *In Utero* to Di(n-butyl) Phthalate. *J. Toxicol. Pathol.* **36**, R1 (2023).
256. Johnson, I., Harman, M., Forrow, D. & Norris, M. An assessment of the feasibility of using image analysis in the oyster embryo-larval development test. *Environ. Toxicol.* **16**, 68–77 (2001).
257. Beasley, A., Elrod-Erickson, M. & Otter, R. R. Consistency of morphological endpoints used to assess developmental timing in zebrafish (*Danio rerio*) across a temperature gradient. *Reprod. Toxicol.* **34**, 561–567 (2012).
258. Foit, K., Kaske, O., Wahrendorf, D.-S., Duquesne, S. & Liess, M. Automated Nanocosm test system to assess the effects of stressors on two interacting populations. *Aquat. Toxicol.* **109**, 243–249 (2012).
259. Singh, R. P. & Ramarao, P. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **213**, 249–259 (2012).
260. Swedin, L. *et al.* Pulmonary exposure to single-walled carbon nanotubes does not affect the early immune response against Toxoplasma gondii. *Part. Fibre Toxicol.* **9**, 16 (2012).
261. L'Azou, B. *et al. Ин витро* models to study mechanisms involved in cyclosporine A-mediated glomerular contraction. *Arch. Toxicol.* **73**, 337–345 (1999).
262. Bolon, B. *et al.* Continuing Education Course #3: Current Practices and Future Trends in Neuropathology Assessment for Developmental Neurotoxicity Testing. *Toxicol. Pathol.* **39**, 289–293 (2011).
263. Dunstan, R. W., Wharton, K. A., Quigley, C. & Lowe, A. The use of immunohistochemistry for biomarker assessment--can it compete with other technologies? *Toxicol. Pathol.* **39**, 988–1002 (2011).
264. Jiang, J.-T. *et al.* Prenatal exposure to di-n-butyl phthalate induces anorectal malformations in male rat offspring. *Toxicology* **290**, 322–326 (2011).
265. Miki, A. *et al.* Imaging of methamphetamine incorporated into hair by MALDI-TOF mass spectrometry. *Forensic Toxicol.* **29**, 111–116 (2011).

266. Zhang, Q., Hitchins, V. M., Schrand, A. M., Hussain, S. M. & Goering, P. L. Uptake of gold nanoparticles in murine macrophage cells without cytotoxicity or production of pro-inflammatory mediators. *Nanotoxicology* **5**, 284–295 (2011).
267. McGee, M. R. *et al.* Predator avoidance performance of larval fathead minnows (Pimephales promelas) following short-term exposure to estrogen mixtures. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* **91**, 355–361 (2009).
268. Calas, A.-G. *et al.* Chronic exposure to glufosinate-ammonium induces spatial memory impairments, hippocampal MRI modifications and glutamine synthetase activation in mice. *NeuroToxicology* **29**, 740–747 (2008).
269. Mundy, W. R., Robinette, B., Radio, N. M. & Freudenrich, T. M. Protein biomarkers associated with growth and synaptogenesis in a cell culture model of neuronal development. *Toxicology* **249**, 220–229 (2008).
270. Pejchal, J., Osterreicher, J., Kassa, J., Tichý, A. & Mokrý, J. Activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) pathways after soman poisoning in rat cerebellar granule neurons. *J. Appl. Toxicol. JAT* **28**, 689–693 (2008).
271. Guerlet, E., Ledy, K. & Giambérini, L. Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail *Radix peregra* (Gastropoda, Pulmonata). *Aquat. Toxicol.* **77**, 19–32 (2006).
272. Alvarado, N. E., Buxens, A., Mazón, L. I., Marigómez, I. & Soto, M. Cellular biomarkers of exposure and biological effect in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu and Zn and after depuration. *Aquat. Toxicol.* **74**, 110–125 (2005).
273. Dhar, P., Jaitley, M., Kalaivani, M. & Mehra, R. D. Preliminary Morphological and Histochemical Changes in Rat Spinal Cord Neurons Following Arsenic Ingestion. *NeuroToxicology* **26**, 309–320 (2005).
274. Mitić, T. & McKay, J. S. Immunohistochemical analysis of acetylation, proliferation, mitosis, and apoptosis in tumor xenografts following administration of a histone deacetylase inhibitor--a pilot study. *Toxicol. Pathol.* **33**, 792–799 (2005).
275. Oberemm, A. *et al.* Differential signatures of protein expression in marmoset liver and thymus induced by single-dose TCDD treatment. *Toxicology* **206**, 33–48 (2005).
276. Colton, H. M. *et al.* Visualization and Quantitation of Peroxisomes Using Fluorescent Nanocrystals: Treatment of Rats and Monkeys with Fibrates and Detection in the Liver. *Toxicol. Sci.* **80**, 183–192 (2004).
277. Garcia, G. *et al.* Study of Tyrosine Hydroxylase Immunoreactive Neurons in Neonate Rats Lactationally Exposed to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *NeuroToxicology* **25**, 951–957 (2004).
278. Duez, P., Dehon, G., Kumps, A. & Dubois, J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* **18**, 159–166 (2003).
279. Cheng, S. H., Chan, P. K. & Wu, R. S. S. The use of microangiography in detecting aberrant vasculature in zebrafish embryos exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* **52**, 61–71 (2001).
280. Tahedl, H. & Häder, D.-P. Automated Biomonitoring Using Real Time Movement Analysis of *Euglena gracilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **48**, 161–169 (2001).
281. Winzer, K., Becker, W., Van Noorden, C. J. F. & Köhler, A. Short-time induction of oxidative stress in hepatocytes of the European flounder (*Platichthys flesus*). *Mar. Environ. Res.* **50**, 495–501 (2000).
282. Antonini, J. M. *et al.* Application of laser scanning confocal microscopy in the analysis of particle-induced pulmonary fibrosis. *Toxicol. Sci.* **51**, 126–134 (1999).
283. Barrouillet, M. P., Moiret, A. & Cambar, J. Protective effects of polyphenols against cadmium-induced glomerular mesangial cell myocontracture. *Arch. Toxicol.* **73**, 485–488 (1999).
284. Smith Orris, A., Banicky, L. C. & Wiens, D. J. Isotretinoin alters morphology, polarity, and motility of neural crest cells in culture. *Reprod. Toxicol.* **13**, 45–52 (1999).

285. Köhler, A. & Van Noorden, C. J. F. Initial velocities *in situ* of G6PDH and PGDH and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA): sensitive diagnostic markers of environmentally induced hepatocellular carcinogenesis in a marine flatfish (*Platichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.* **40**, 233–252 (1998).
286. McDonald-Taylor, C. K., Singh, A. & Gilman, A. Uranyl Nitrate—Induced Proximal Tubule Alterations in Rabbits: A Quantitative Analysis. *Toxicol. Pathol.* **25**, 381–389 (1997).
287. Wu, C., Fry, C. H. & Henry, J. A. Membrane toxicity of opioids measured by protozoan motility. *Toxicology* **117**, 35–44 (1997).
288. Anderson, D., Yu, T.-W. & Schmezer, P. An investigation of the DNA-damaging ability of benzene and its metabolites in human lymphocytes, using the comet assay. *Environ. Mol. Mutagen.* **26**, 305–314 (1995).
289. Harkema, J. R. & Hotchkiss, J. A. Ozone- and endotoxin-induced mucous cell metaplasias in rat airway epithelium: Novel animal models to study toxicant-induced epithelial transformation in airways. *Toxicol. Lett.* **68**, 251–263 (1993).
290. Luthman, J. *et al.* Combined lead acetate and disulfiram treatment-induced alterations of glial fibrillary acidic protein (GFA) immunoreactive astrocytes in brain smears. *Toxicology* **65**, 333–346 (1991).
291. Andrade, C. Types of Analysis: Planned (prespecified) vs Post Hoc, Primary vs Secondary, Hypothesis-driven vs Exploratory, Subgroup and Sensitivity, and Others. *Indian J. Psychol. Med.* **45**, 640–641 (2023).
292. Alfaro, J. M., Ripoll-Gómez, J. & Burgos, J. S. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *Eur. J. Neurosci.* **33**, 1252–1255 (2011).
293. Li, Y. *et al.* Novel functional properties of Drosophila CNS glutamate receptors. *Neuron* **92**, 1036–1048 (2016).
294. Polinski, J. M., Kron, N., Smith, D. R. & Bodnar, A. G. Unique age-related transcriptional signature in the nervous system of the long-lived red sea urchin Mesocentrotus franciscanus. *Sci. Rep.* **10**, 9182 (2020).
295. Onakpoya, I., Heneghan, C. & Aronson, J. Worldwide withdrawal of medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review and analysis. *Crit. Rev. Toxicol.* **46**, 1–13 (2016).
296. Serag, A. *et al.* Translational AI and Deep Learning in Diagnostic Pathology. *Front. Med.* **6**, (2019).
297. Suarez-Arnedo, A. *et al.* An image J plugin for the high throughput image analysis of *ин витро* scratch wound healing assays. *PLoS ONE* **15**, e0232565 (2020).
298. Nürnberg, E. *et al.* Routine Optical Clearing of 3D-Cell Cultures: Simplicity Forward. *Front. Mol. Biosci.* **7**, (2020).
299. von Chamier, L. *et al.* Democratising deep learning for microscopy with ZeroCostDL4Mic. *Nat. Commun.* **12**, 2276 (2021).
300. Klein, C. J. M. I. *et al.* Measuring Locomotor Activity and Behavioral Aspects of Rodents Living in the Home-Cage. *Front. Behav. Neurosci.* **16**, 877323 (2022).
301. Wilkinson, M. D. *et al.* The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Sci. Data* **3**, 160018 (2016).
302. Sinaci, A. A. *et al.* From Raw Data to FAIR Data: The FAIRification Workflow for Health Research. *Methods Inf. Med.* **59**, e21–e32 (2020).
303. Kemmer, I. *et al.* Building a FAIR image data ecosystem for microscopy communities. *Histochem. Cell Biol.* **160**, 199–209 (2023).
304. Turner, O. C. *et al.* Society of Toxicologic Pathology Digital Pathology and Image Analysis Special Interest Group Article*: Opinion on the Application of Artificial Intelligence and Machine Learning to Digital Toxicologic Pathology. *Toxicol. Pathol.* **48**, 277–294 (2020).
305. von Krogh, G. & Spaeth, S. The open source software phenomenon: Characteristics that promote research. *J. Strateg. Inf. Syst.* **16**, 236–253 (2007).

306. Tinevez, J.-Y. *et al.* TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **115**, 80–90 (2017).
307. Sage, D. *et al.* DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods* **115**, 28–41 (2017).
308. Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D. & Clement, M.-V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.* **2**, 457–465 (2014).
309. Tischer, C., Schindelin, J., Rueden, C. & Hiner, M. Linear Kuwahara Filter Plugin. (2017).
310. Varghese, F., Bukhari, A. B., Malhotra, R. & De, A. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. *PLoS ONE* **9**, e96801 (2014).
311. Carpenter, A. E. *et al.* CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* **7**, R100 (2006).
312. Jones, T. R. *et al.* CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens. *BMC Bioinformatics* **9**, 482 (2008).
313. Merkel, D. & others. Docker: lightweight linux containers for consistent development and deployment. *Linux J* **239**, 2 (2014).
314. Cito, J. *et al.* An Empirical Analysis of the Docker Container Ecosystem on GitHub. in *2017 IEEE/ACM 14th International Conference on Mining Software Repositories (MSR)* 323–333 (2017). doi:10.1109/MSR.2017.67.
315. de Chaumont, F. *et al.* Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods* **9**, 690–696 (2012).
316. Van Rossum, G. & Drake Jr, F. L. *Python Tutorial*. vol. 620 (Centrum voor Wiskunde en Informatica Amsterdam, The Netherlands, 1995).
317. Rossum, G. V. Python Software Foundation. Python Language Reference, Version 2.7. (1995).
318. The Galaxy Community. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Res.* **50**, W345–W351 (2022).
319. Berthold, M. R. *et al.* KNIME - the Konstanz Information Miner: Version 2.0 and Beyond. *SIGKDD Explor Newsl* **11**, 26–31 (2009).
320. Pfeuffer, A. F. C. D. J. KNIME for reproducible cross-domain analysis of life. *J. Proteome Res.* **7**, 3354–63 (2008).
321. Bitter, R., Mohiuddin, T. & Nawrocki, M. *LabVIEW: Advanced Programming Techniques*. (CRC press, 2017).
322. Mir, S. B. & Llueca, G. F. Introduction to Programming Using Mobile Phones and MIT App Inventor. *IEEE Rev. Iberoam. Tecnol. Aprendiz.* **15**, 192–201 (2020).
323. Dietz, C. *et al.* Integration of the ImageJ Ecosystem in KNIME Analytics Platform. *Front. Comput. Sci.* **2**, (2020).
324. Lu, M. Y. *et al.* A Foundational Multimodal Vision Language AI Assistant for Human Pathology. Preprint at https://doi.org/10.48550/arXiv.2312.07814 (2023).
325. Haase, R. *et al.* A Hitchhiker's guide through the bio-image analysis software universe. *FEBS Lett.* **596**, 2472–2485 (2022).
326. Rueden, C *et al.* ImageJ Ops. (2021).
327. Sommer, C., Straehle, C., Kothe, U. & Hamprecht, F. A. Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit. in *2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro* 230–233 (IEEE, Chicago, IL, USA, 2011). doi:10.1109/ISBI.2011.5872394.
328. Mathis, A. *et al.* DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat. Neurosci.* **21**, 1281–1289 (2018).
329. Jenkinson, M., Beckmann, C. F., Behrens, T. E. J., Woolrich, M. W. & Smith, S. M. FSL. *NeuroImage* **62**, 782–790 (2012).

330. Eaton, J. W., Bateman, D., Hauberg, S. & Wehbring, R. *GNU Octave Version 5.2.0 Manual: A High-Level Interactive Language for Numerical Computations*. (2020).
331. Stallman, R. & others. The GNU manifesto. (1985).
332. Carnë Draug, Hartmut Gimpel, & Avinoam Kalma. Image package. (2022).
333. napari: a multi-dimensional image viewer for Python. doi:10.5281/zenodo.8115575.
334. Jia, L. *et al.* Development of interactive biological web applications with R/Shiny. *Brief. Bioinform.* **23**, bbab415 (2022).
335. Ooms, J. magick: advanced graphics and image-processing in R. *CRAN R Package Version* **1**, (2018).
336. Austenfeld, M. & Beyschlag, W. A Graphical User Interface for R in a Rich Client Platform for Ecological Modeling. *J. Stat. Softw.* **49**, 1–19 (2012).
337. Contributors, N. Napari: a fast, interactive, multi-dimensional image viewer for python. (2019).
338. Harris, C. R. *et al.* Array programming with NumPy. *Nature* **585**, 357–362 (2020).
339. NumPy - Case Study: First Image of a Black Hole. https://numpy.org/case-studies/blackhole-image/.
340. LIGO Scientific Collaboration and Virgo Collaboration *et al.* Observation of Gravitational Waves from a Binary Black Hole Merger. *Phys. Rev. Lett.* **116**, 061102 (2016).
341. NumPy - Case Study: Discovery of Gravitational Waves. https://numpy.org/case-studies/gw-discov/.
342. Chael, A. A. *et al.* HIGH-RESOLUTION LINEAR POLARIMETRIC IMAGING FOR THE EVENT HORIZON TELESCOPE. *Astrophys. J.* **829**, 11 (2016).
343. Virtanen, P. *et al.* SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat. Methods* **17**, 261–272 (2020).
344. Walt, S. van der *et al.* scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* **2**, e453 (2014).
345. Berman, A. G., Orchard, W. R., Gehrung, M. & Markowetz, F. PathML: A unified framework for whole-slide image analysis with deep learning. 2021.07.07.21260138 Preprint at https://doi.org/10.1101/2021.07.07.21260138 (2021).
346. Brahmbhatt, S. *Practical OpenCV*. (Apress, 2013).
347. Hangün, B. & Eyecioğlu, Ö. Performance Comparison Between OpenCV Built in CPU and GPU Functions on Image Processing Operations. *Int. J. Eng. Sci. Appl.* **1**, 34–41 (2017).
348. Pulli, K., Baksheev, A., Kornyakov, K. & Eruhimov, V. Real-time computer vision with OpenCV. *Commun. ACM* **55**, 61–69 (2012).
349. Wink, S., Burger, G. A., Dévédec, S. E. L., Beltman, J. B. & Water, B. van de. User-friendly high-content imaging analysis on a single desktop: R package H5CellProfiler. 2022.10.06.511212 Preprint at https://doi.org/10.1101/2022.10.06.511212 (2022).
350. Marques, O. *Practical Image and Video Processing Using MATLAB*. (John Wiley & Sons, 2011).
351. Pajankar, A. & Chandu, S. Image and Video Processing. in *GNU Octave by Example: A Fast and Practical Approach to Learning GNU Octave* (eds. Pajankar, A. & Chandu, S.) 147–161 (Apress, Berkeley, CA, 2020). doi:10.1007/978-1-4842-6086-9_9.
352. Stritt, M., Stalder, A. K. & Vezzali, E. Orbit Image Analysis: An open-source whole slide image analysis tool. *PLOS Comput. Biol.* **16**, e1007313 (2020).
353. Marée, R. *et al.* Collaborative analysis of multi-gigapixel imaging data using Cytomine. *Bioinformatics* **32**, 1395–1401 (2016).
354. Miura, K. *et al.* Bioimage Analysis Tools. (2020).
355. Allan, C. *et al.* OMERO: flexible, model-driven data management for experimental biology. *Nat. Methods* **9**, 245–253 (2012).
356. Edelstein, A., Amodaj, N., Hoover, K., Vale, R. & Stuurman, N. Computer Control of Microscopes Using µManager. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **92**, 14.20.1-14.20.17 (2010).

357. Edelstein, A. D. *et al.* Advanced methods of microscope control using μManager software. *J. Biol. Methods* **1**, e10 (2014).
358. Bauch, A. *et al.* OpenBIS: A flexible framework for managing and analyzing complex data in biology research. *BMC Bioinformatics* **12**, 468 (2011).
359. Performance Analysis of Google Colaboratory as a Tool for Accelerating Deep Learning Applications | IEEE Journals & Magazine | IEEE Xplore. https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/8485684.
360. Ouyang, W., Mueller, F., Hjelmare, M., Lundberg, E. & Zimmer, C. ImJoy: an open-source computational platform for the deep learning era. *Nat. Methods* **16**, 1199–1200 (2019).
361. Haberl, M. G. *et al.* CDeep3M - Plug-and-Play cloud based deep learning for image segmentation of light, electron and X-ray microscopy. 353425 Preprint at https://doi.org/10.1101/353425 (2018).
362. Gómez-de-Mariscal, E. *et al.* DeepImageJ: A user-friendly environment to run deep learning models in ImageJ. *Nat. Methods* **18**, 1192–1195 (2021).
363. Stevens, M. *et al.* StarDist Image Segmentation Improves Circulating Tumor Cell Detection. *Cancers* **14**, 2916 (2022).
364. Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C. & Myers, G. Cell Detection with Star-Convex Polygons. in *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018* (eds. Frangi, A. F., Schnabel, J. A., Davatzikos, C., Alberola-López, C. & Fichtinger, G.) 265–273 (Springer International Publishing, Cham, 2018). doi:10.1007/978-3-030-00934-2_30.
365. Jacquemet, G. Deep learning to analyse microscopy images. *The Biochemist* **43**, 60–64 (2021).
366. Nath, T. *et al.* Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nat. Protoc.* **14**, 2152–2176 (2019).
367. Deschamps, J., Dalle Nogare, D. & Jug, F. Better research software tools to elevate the rate of scientific discovery or why we need to invest in research software engineering. *Front. Bioinforma.* **3**, 1255159 (2023).
368. What's next for bioimage analysis? *Nat. Methods* **20**, 945–946 (2023).
369. Yordanov, Y. I. Hep G2 cell culture confluence measurement in phase-contrast micrographs – a user-friendly, open-source software-based approach. *Toxicol. Mech. Methods* **30**, 146–152 (2020).
370. Bruggisser, R., von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W. & Tullberg-Reinert, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.* **68**, 445–448 (2002).
371. Langdon, S. P. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. (Humana Press, Totowa, N.J, 2004).
372. Karakaş, D., Ari, F. & Ulukaya, E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turk. J. Biol. Turk Biyol. Derg.* **41**, 919–925 (2017).
373. Sardão, V. A., Oliveira, P. J., Holy, J., Oliveira, C. R. & Wallace, K. B. Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide – characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biol.* **8**, 11 (2007).
374. Helmy, I. M. & Abdel Azim, A. M. Efficacy of ImageJ in the assessment of apoptosis. *Diagn. Pathol.* **7**, 15 (2012).
375. Povea-Cabello, S. *et al.* Dynamic Reorganization of the Cytoskeleton during Apoptosis: The Two Coffins Hypothesis. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
376. Kalinova, R. *et al.* Cinnamyl modified polymer micelles as efficient carriers of caffeic acid phenethyl ester. *React. Funct. Polym.* **157**, 104763 (2020).
377. Groebe, K. *et al.* Unexpected common mechanistic pathways for embryotoxicity of warfarin and lovastatin. *Reprod. Toxicol.* **30**, 121–130 (2010).

378. Mackay, C. R. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat. Immunol.* **9**, 988–998 (2008).
379. Tsai, W.-C. *et al.* Ciprofloxacin-mediated inhibition of tenocyte migration and down-regulation of focal adhesion kinase phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* **607**, 23–26 (2009).
380. Zhao, X.-K. *et al.* Focal Adhesion Kinase Regulates Fibroblast Migration via Integrin beta-1 and Plays a Central Role in Fibrosis. *Sci. Rep.* **6**, 19276 (2016).
381. Jiang, D. *et al.* Injury triggers fascia fibroblast collective cell migration to drive scar formation through N-cadherin. *Nat. Commun.* **11**, 5653 (2020).
382. Knoedler, S. *et al.* Fibroblasts – the cellular choreographers of wound healing. *Front. Immunol.* **14**, 1233800 (2023).
383. Stuelten, C. H., Parent, C. A. & Montell, D. J. Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 296–312 (2018).
384. Mu, H. *et al.* Low doses of deoxynivalenol inhibit the cell migration mediated by H3K27me3-targeted downregulation of TEM8 expression. *Biochem. Pharmacol.* **175**, 113897 (2020).
385. Egbowon, B. F., Harris, W., Arnott, G., Mills, C. L. & Hargreaves, A. J. Sub-lethal concentrations of CdCl2 disrupt cell migration and cytoskeletal proteins in cultured mouse TM4 Sertoli cells. *Toxicol. Ин витро* **32**, 154–165 (2016).
386. Devreotes, P. & Horwitz, A. R. Signaling Networks that Regulate Cell Migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a005959 (2015).
387. Jonkman, J. E. N. *et al.* An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhes. Migr.* **8**, 440–451 (2014).
388. Baecker, V. ImageJ Macro Tool Sets for Biological Image Analysis. (2012) doi:10.13140/RG.2.1.2868.9446.
389. Końca, K. *et al.* A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **534**, 15–20 (2003).
390. Kopp, B., Khoury, L. & Audebert, M. Validation of the γH2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Arch. Toxicol.* **93**, 2103–2114 (2019).
391. Cordelli, E., Bignami, M. & Pacchierotti, F. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicol. Res.* **10**, 68–78 (2021).
392. Hartmann, A. *et al.* Recommendations for conducting the *ин виво* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* **18**, 45–51 (2003).
393. Singer, V. L., Lawlor, T. E. & Yue, S. Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **439**, 37–47 (1999).
394. Miyamae, Y., Zaizen, K., Ohara, K., Mine, Y. & Sasaki, Y. F. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat. Res.* **393**, 99–106 (1997).
395. Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P. & Jha, A. N. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol. Toxicol.* **25**, 53–64 (2009).
396. Georgiev, G. P. *et al.* A comparative study of the epiligament of the medial collateral and anterior cruciate ligaments in the human knee: Immunohistochemical analysis of CD 34, α-smooth muscle actin and vascular endothelial growth factor in relation to epiligament theory. *The Knee* **39**, 78–90 (2022).
397. Niazi, M. K. K., Parwani, A. V. & Gurcan, M. N. Digital pathology and artificial intelligence. *Lancet Oncol.* **20**, e253–e261 (2019).
398. Zarella, M. D. *et al.* A Practical Guide to Whole Slide Imaging: A White Paper From the Digital Pathology Association. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **143**, 222–234 (2019).
399. Siwczak, F., Hiller, C., Pfannkuche, H. & Schneider, M. R. Culture of vibrating microtome tissue slices as a 3D model in biomedical research. *J. Biol. Eng.* **17**, 36 (2023).

400. Georgiev, G. P. *et al.* A comparative study of the epiligament of the medial collateral and the anterior cruciate ligament in the human knee. Immunohistochemical analysis of collagen type I and V and procollagen type III. *Ann. Anat. - Anat. Anz.* **224**, 88–96 (2019).
401. Yoncheva, K. *et al.* Encapsulation of doxorubicin in chitosan-alginate nanoparticles improves its stability and cytotoxicity in resistant lymphoma L5178 MDR cells. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **59**, 101870 (2020).
402. Motlagh, N. S. H., Parvin, P., Ghasemi, F. & Atyabi, F. Fluorescence properties of several chemotherapy drugs: doxorubicin, paclitaxel and bleomycin. *Biomed. Opt. Express* **7**, 2400–2406 (2016).
403. Berlin, G. & Enerbäck, L. Fluorescent Berberine Binding as a Marker of Secretory Activity in Mast Cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **71**, 332–339 (2009).
404. Matsson, P., Pedersen, J. M., Norinder, U., Bergström, C. A. S. & Artursson, P. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharm. Res.* **26**, 1816–1831 (2009).
405. Schneckenburger, H. *et al.* Light exposure and cell viability in fluorescence microscopy. *J. Microsc.* **245**, 311–318 (2012).